

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno – matematički fakultet

Biološki odsjek

Mateja Bašić

**Optimizacija lančane reakcije polimerazom za umnažanje mikrosatelitnih
biljega gena Dishevelled1 u glioblastomima**

Diplomski rad

Zagreb, 2014. godina

Ovaj rad, izrađen na Hrvatskom Institutu za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u Laboratoriju na neuroonkologiju pod vodstvom prof.dr.sc. Nives Pečina-Šlaus, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

ZAHVALE

Zahvaljujem svojoj mentorici, prof.dr.sc. Nives Pešina – Šlaus, na strpljenju, savjetima i stručnom vodstvu u izvedbi i pisanju diplomskog rada.

Također, zahvaljujem znanstvenoj novakinji Anji Kafka na pomoći u eksperimentalnom dijelu rada, kao i na savjetima, strpljenju i podršci.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

OPTIMIZACIJA LANČANE REAKCIJE POLIMERAZOM ZA UMNAŽANJE MIKROSATELITNIH BILJEGA GENA *DISHEVELLED1* U GLIOBLASTOMIMA

Mateja Bašić
Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb

Glioblastomi su najzloćudniji i najinvazivniji tumori središnjeg živčanog sustava, te se prema kriterijima Svjetske zdravstvene organizacije svrstavaju pod astrocitome gradusa IV. Nastaju ili *de novo* ili iz astrocitoma nižeg gradusa, te oba oblika imaju karakteristične genetičke promjene. U razvoju bolesti uključeni su specifični signalni putevi među kojima je i signalni put Wnt. On je posebice važan tijekom embrionalnog razvoja, diferencijacije i stanične smrti, a njegovo neispravno funkcioniranje uključeno je u nastanak brojnih tumora. Protein Dishevelled1 (DVL1) je citoplazmatski fosfoprotein, prvi u nizu nizvodno od receptora Frizzled (Fz) i jedna je od ključnih molekula signalnog puta Wnt. Kada se put Wnt aktivira, signal se prenosi interakcijom Fz sa DVL1 koji zatim inhibira aktivnost degradacijskog kompleksa. To rezultira ulaskom β -katenina u jezgru, te transkripcijom ciljnih gena. Ukoliko je signalizacija posredovana DVL1 nepravilna, može doći do nastanka i invazivnosti tumora. Vjerujemo da su genetičke promjene gena *DVL1* uključene u nastanak glioblastoma, te je cilj ovog rada optimizirati uvjete metode lančane reakcije polimerazom (PCR) za umnažanje mikrosatelitnih biljega za gen *DVL1*. Ovako optimiziranim uvjetima reakcije umnožit će se vrlo specifični biljezi kojima će se nastojati odrediti mikrosatelitna nestabilnost i gubitak heterozigotnosti gena *DVL1*. Rezultati ovog diplomskog rada doprinijet će boljem i specifičnijem umnažanju mikrosatelitnih biljega za *DVL1*.

(46 stranica, 10 slika, 5 tablica, 45 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: protein Dishevelled1; signalni put Wnt; optimizacija uvjeta za PCR

Voditelj: Dr. Sc. Nives Pečina-Šlaus (red. prof.)

Suvoditelj: Dr.sc. Dubravka Hranilović (izv. prof.)

Ocjenitelji: Dr. sc. Dubravka Hranilović (izv.prof.)

Dr. sc. Inga Marijanović (docentica)

Dr. Sc. Martina Šeruga-Musić (docentica)

Rad prihvaćen: 18. Lipnja 2014.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of biology

Graduation Thesis

OPTIMIZATION OF POLYMERASE CHAIN REACTION FOR AMPLIFICATION OF MICROSATELLITE MARKERS OF DISHEVELLED1 GENE IN GLIOBLASTOMAS

Mateja Ba i
Rooseveltovej 6, 10 000 Zagreb, Croatia

Glioblastomas are the most aggressive and the most invasive tumors of central nervous system, and are classified as grade IV astrocytoma by the criteria of the World Health Organization. They can develop either *de novo* or from a lower-grade astrocytoma, and each type has its own characteristics genetic changes. There are specific signalling pathways involved in disease development, among which is Wnt pathway. Wnt pathway is important during normal embryonic development, differentiation and apoptosis, and its disrupted functioning is involved in tumor development. Protein Dishevelled1 (DVL1) is cytoplasmatic phosphoprotein, it comes first in downstream cascade from receptor Frizzled (Fz) and it is one of the crucial molecules of Wnt signalling pathway. When Wnt pathway is activated, signal is transmitted by the interaction of Fz with DVL1 which then inhibits activity of degradation complex. It results in β -catenin entering the nucleus and by transcription of target genes. If the signalization mediated by DVL1 is disrupted, it results in tumor development and progression. We believe that genetic changes of in *DVL1* gene are involved in occurrence of glioblastomas, so the goal of this research is to optimize the conditions of the Polymerase Chain Reaction (PCR) for amplification of microsatellite markers of *DVL1* gene. In those optimized conditions, very specific markers will be amplified and they will be used for microsatellite instability and loss of heterozygosity analyses of *DVL1* gene. Results of this research will contribute to more successful and more specific amplification of microsatellite markers for *DVL1* gene.

(46 pages, 10 figures, 5 tables, 45 references, original in: Croatian)

Key words: protein Dishevelled1; Wnt signalling pathway; optimization of PCR conditions

Supervisor: Dr. Nives Pešina-Šlaus (Prof.)

Cosupervisor: Dr. Dubravka Hranilović (Assoc. Prof.)

Reviewers: Dr. Dubravka Hranilović (Assoc. Prof.)
Dr. Inga Marijanović (Assist. Prof.)
Dr. Martina Šeruga-Musić (Assist. Prof.)

Thesis accepted: June 18th 2014

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Glioblastomi.....	1
1.2. Signalni put wnt.....	5
1.3. Protein Dishevelled (DVL).....	9
1.4. Lan ana reakcija polimerazom	13
1.5. Mikrosatelitni biljezi	16
2. Cilj istraživanja	17
3. Materijali i metode	18
3.2. Uzorci tkiva.....	18
3.3. Izolacija DNA iz tkiva tumora	19
3.4. Izolacija DNA iz periferne krvi	20
3.5. Određivanje koncentracije DNA.....	20
3.6. Umnažanje DNA lan anom reakcijom polimeraze.....	21
3.7. Elektroforeza DNA na agaroznom gelu	22
3.8. Dodatne analize umnožene DNA Spreadex-gelom.....	23
4. Rezultati	24
4.1. Koncentracija i kvaliteta izolirane DNA iz glioblastoma i krvi.....	24
4.2. Rezultati PCR-a za umnažanje biljega D1S468.....	25
5. Rasprava.....	33
6. Zaključak.....	36
7. Literatura.....	37

POPIS KRATICA

CDK4 – ciklin-ovisna kinaza 4 (*cyclin-dependent kinase 4*)

CDKN2A - cyclin-dependent kinase inhibitor 2A provided by HGNC

CK1 – ciklin kinaza 1 (*cyclin kinase 1*)

EGFR - receptor epidermalnog faktora rasta (*epidermal growth factor*)

GBM – *Glioblastoma multiforme*

GSK3 - *glycogen synthase kinase-3*

HIF-1 - *Hypoxia-inducible factor 1-alpha*

LDL – lipoprotein niske gustoće (*low density lipoprotein*)

LEF – *lymphoid-enhancing factor*

MDM2 - *murine double minute 2*

MDM4 - *murine double minute 4*

mTOR - *mechanistic target of rapamycin*

PI3K – fosfatilinozitol-3-kinaza (*phosphatidylinositol-3-kinase*)

PTEN – homolog fosfataze i tenzina (*phosphatase and tensin homolog*)

Rb1 – retinoblastoma 1 (*retinoblastoma 1*)

RNA – ribonukleinska kiselina (*ribonucleic acid*)

SŽS – središnji živčani sustav

TCF – faktor T-limfocita (*T-cell factor*)

TLE – *transducin-like enhancer protein*

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija (*World Health Organization*)

1. Uvod

1.1. Glioblastomi

Glioblastomi su najčešći i tumori središnjeg živčanog sustava (SŽS) kod odraslih a *glioblastoma multiforme* (GBM) čini gotovo polovicu takvih slučajeva. GBM je jedan od najagresivnijih astrocitnih tumora te je unatoč desetljećima proučavanja i dalje fatalan vrlo brzo nakon dijagnoze, najčešće izmire u 9 i 11 mjeseci (Collins 2004). Kao što mu i samo ime kaže, ovaj tumor potječe od glija stanica, odnosno astrocita a izraz *glioblastoma multiforme* opisuje njegove histopatološke karakteristike: raznolika morfologija i heterogene populacije stanica koje se razlikuju po mnogim biološkim osobinama kao što su razina proliferacije, invazivnost u okolna tkiva, izgled, otpornost na terapiju itd. (Bonavia i sur. 2011).

Astrocitomi se obično klasificiraju po sustavu Svjetske zdravstvene organizacije (*World health organization*, WHO) koji se temelji na histološkim karakteristikama kao što su: staničnost, mitotska aktivnost, atipičnost jezgre, vaskularnost i nekroza. Cilj Organizacije je stvoriti međunarodno prihvatljiv sustav klasifikacije ljudskih tumora, s jasno definiranim histološkim kriterijima te kriterijima za kliničku dijagnozu (Louis i sur. 2007). Međutim, odmah valja napomenuti da ovaj sustav klasifikacije nije dovoljan za budući razvoj terapija te je nužna klasifikacija na genetici koja razini za bolje predviđanje odgovora na terapiju, te klasifikacija koja ima bolji temelj za razvoj personaliziranih tretmana za pacijente s gliomima. (Mason i Cairncross 2008).

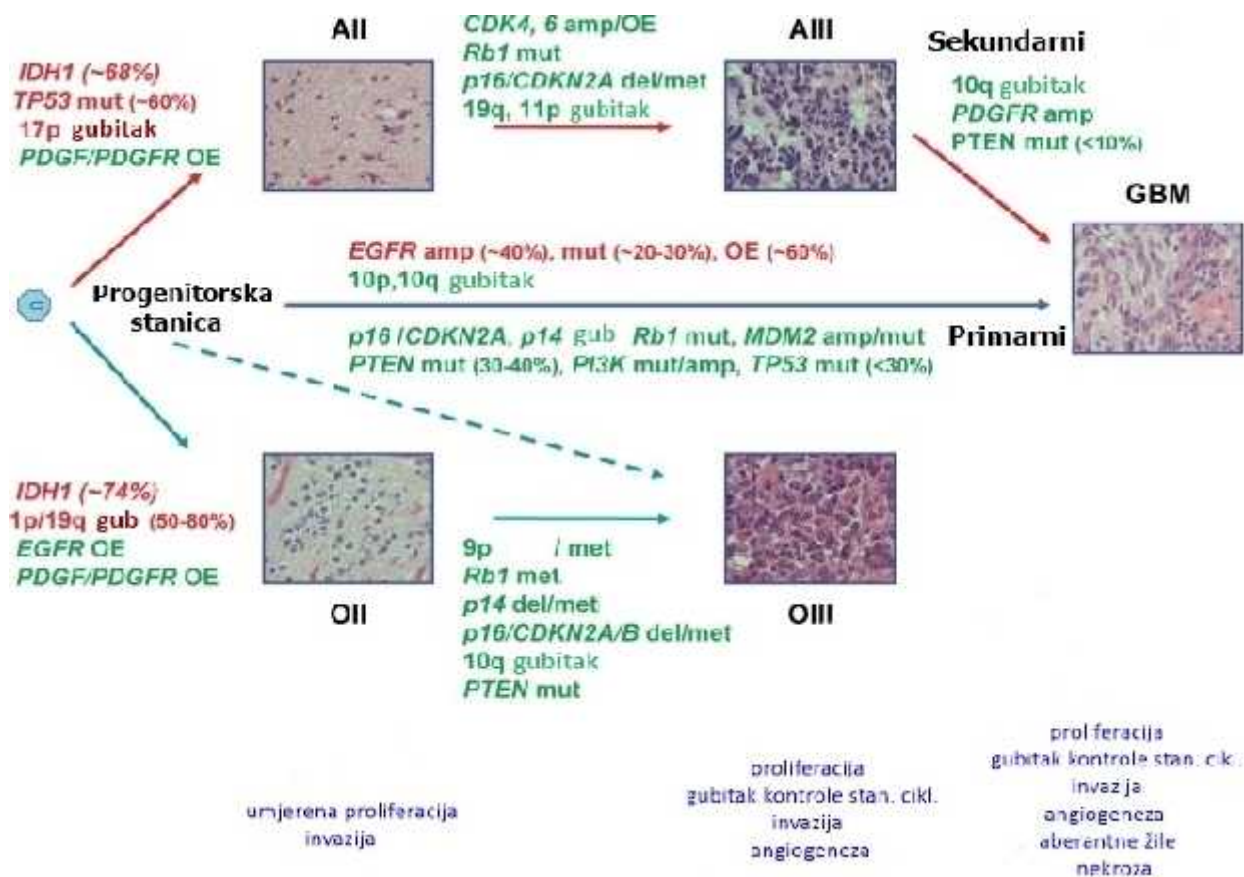
Što su tumorske stanice bolje diferencirane, to su sličnije svojim normalnim stanicama prethodnicama. Međutim, progresijom anaplastičnih promjena i gubitkom diferenciranosti tumorskih stanica, navedena sličnost postaje sve manja te se na kraju u potpunosti gubi. Zbog toga anaplastični tumori više slični su jednom drugome nego tkivu/stanicama iz kojih su potekli. Klasifikacija WHO razlikuje četiri stupnja diferencijacije tumora SŽS-a, pri čemu dobro diferencirani tumori, dobro udni tumori imaju stupanj diferencijacije (gradus) I, dok najzloudniji i najslabije diferencirani tumori imaju stupanj IV (Pažanin 2011). Gradus I je astrocitom sa najboljom prognozom za pacijenta: benigni je i raste sporo zbog malog proliferacijskog potencijala. Kao terapija najčešće je dovoljan kirurški zahvat za potpuno uklanjanje tumora. Gradus II pokazuje blagu malignost i difuzno prodiranje u okolna tkiva. Gradusi III i IV su vrlo maligni. Vrlo su agresivni i invazivni s brzim napretkom. (Alcantara

Llaguno i sur. 2009). Prema kriterijima svjetske zdravstvene organizacije glioblastomi se svrstavaju u astrocitome gradusa IV (Walker i sur. 2011).

Glioblastomi se obično javljaju u subkortikalnoj bijeloj tvari moždanih hemisfera i to najčešće u temporalnom, zatim parijentalnom i frontalnom režnju. Vrlo rijetki su glioblastomi moždanog debla, malog mozga te drugih drugih dijelova središnjeg živčanog sustava. Ovaj tumor može biti vrlo raznolik kako mikroskopski tako i makroskopski. Neka područja mogu biti tvrda i siva dok su druga žuta i mekana. Često su vidljiva i područja nekroze, cista i krvarenja. Glioblastomi često imaju veliku središnju nekrozu koja može zahvatiti i do 80% njegovog volumena. Znaju biti prisutne i makroskopske ciste koje sadrže mutnu tekućinu nekrotičnog sadržaja. Mikroskopski gledano, stanice su polimorfne, često su nekroze te mikrovaskularna proliferacijska i mitotska aktivnost (Pažanin 2011). Ta izražena angiogeneza rezultira brojnim propusnim i neinkovitim žilama koje ne mogu držati korak s dijelovima tumora u kojima stanice nekontrolirano proliferiraju. Još jedna od karakteristika glioblastoma je i agresivno prodiranje tumorskih stanica, odnosno invazija u okolno, zdravo tkivo mozga što doprinosi ponovnoj aktivaciji tumora te samoj smrtnosti (Belden i sur. 2011).

Glioblastomi čine 12-15% svih tumora mozga te pogađaju sve dobne skupine, no najviše se javljaju kod osoba iznad 65 godina s nešto većom incidencijom kod muškaraca nego kod žena. Na liječenje glioblastoma uključuju: kirurško uklanjanje tumora, radioterapiju i kemoterapiju no unatoč tome smrtnost među pacijentima je vrlo velika. Sama etiopatogeneza glioblastoma nije poznata, ali znamo da ovi tumori mogu nastati na dva načina koji se klinički i molekularno razlikuju. Jedan način je nastanak iz bolje diferenciranih astroglijalnih tumora te tako nastaje oko 10% svih glioblastoma. Tako nastale glioblastome nazivamo sekundarnima a najčešće molekularno-genetičko obilježje im je mutacija *TP53* gena. Drugu, puno veću skupinu, čine glioblastomi koji nastaju *de novo*. Oni čine oko 90% glioblastoma te ih nazivamo primarnima. Njihovo najčešće molekularno-genetičko obilježje je amplifikacija gena *EGFR* (eng. *epidermal growth factor receptor*) (Pažanin 2011). Unatoč velikoj histološkoj sličnosti, ove dvije vrste glioblastoma razdvajaju mnoge druge karakteristike kao što su dob pacijenata (primarni uglavnom muškarce oko 62 godine starosti, dok su sekundarni češći i kod žena s oko 45 godina starosti), razni molekularni mehanizmi uključeni u nastanak tumora, uzorci ekspresije RNA i proteina te odgovor na radioterapiju i kemoterapiju (Oghaki i Kleihues 2007).

Općenito, glioblastomi pokazuju najviše genetičkih promjena s obzirom na ostale astrocitne tumore. Neke od tih promjena su: amplifikacije onkogene i njihova prekomjerna ekspresija, mutacije u genima tumor-supresora i proteinima za popravak DNA, gubitak heterogenosti nekih dijelova kromosoma te epigenetičke promjene poput hipermetilacije promotorskih regija. (Walker i sur. 2011). Upravo ove promjene rezultiraju nekontroliranom proliferacijom, gubitkom normalnih kontrolnih mehanizama staničnog ciklusa, sprječavanjem apoptoze, neučinkovitim popravkom oštećene DNA, povećanjem genske nestabilnosti i gubitkom kontrole nad signalnim putevima faktora rasta (Alcantara Llaguno i sur. 2009). Progresija astrocitoma nižeg gradusa do višeg stupnja postupnim nakupljanjem genetičkih promjena je prikazana na Slici 1.



Slika 1. Molekularna patogeneza astrocitnih tumora. Glioblastomi nastaju *de novo* ili napreduju iz astrocitoma nižeg gradusa. Iako se klinički ne mogu razlikovati, mogu se odvojiti na temelju spektra genetskih promjena no te genetske promjene ne pripadaju isključivo jednoj ili drugoj liniji. Najčešće genetičke promjene koje se koriste za razlikovanje molekularnih podtipova glioma su prikazane crveno. AIII – astrocitomi gradusa III; amp – amplifikacija; del – delecija; GBM – glioblastom gradusa IV; meth – metilacija; mut – mutacija; OII – oligodendrogliom gradusa II; OIII – oligodendrogliom gradusa III; OE – povećana izraženost. (preuzeto i prilagođeno iz Walker i sur. 2011).

Iako su ove genetičke promjene mnogobrojne i raznolike, većina ponavlja ih mutacija ipak zahvaća najveće signalne puteve kao što su putevi tirozin-kinaznih receptora, proteina PTEN i PI3K te tumorskih supresora p53 i Rb1. Do sada su nenormalni signalni putevi PI3K/PTEN pronađeni u više od 80% glioblastoma. Glavne stanične funkcije ovih puteva su kontrola staničnog procesa kao što su stanično dijeljenje, migracija i preživljavanje koje se ostvaruju putem izvanstaničnih signala (npr. faktora rasta, stanične adhezije, kontakta s izvanstaničnim okolišem koji se vežu na transmembranske receptore kao što je EGFR. Kontrola se može ostvariti i integrinima koji prenose signal fosforilacijom posredovanom kinazama. Promjene u putu wnt mogu dovesti do povećane nizvodne aktivnosti koja rezultira proangiogenom signalizacijom te povećanom proliferacijom i preživljenjem abnormalnih stanica. Neke od tih promjena su povećana ekspresija uslijed amplifikacije ili mutacije ključnih receptora poput EGFR, povećana aktivnost uslijed amplifikacije ili mutacije nizvodnih gena u putu PI3K ili smanjene aktivnosti uslijed delecije tumor-supresora kao što su inhibitori PI3K i RAS i nizvodni supresori poput mTOR i p53. Na kraju, ove promjene mogu dovesti do nekontrolirane stanične proliferacije, staničnog preživljenja i migracije stanica glioblastoma, kao i do povećanja razine HIF-1 faktora (*eng. hypoxia-inducible factor 1 alpha*) koji je ključan na komponenta staničnog metabolizma i angiogeneze.

Što se tiče promjena u putu tumorskog supresora p53, poznato je da se on inaktivira u više od 80% pacijenata sa glioblastomima. Kada se u zdravoj stanici pojavi greška u DNA, p53 kontrolira stanični ciklus na način da stanici daje vremena za popravak DNA ili poticanjem apoptoze za uništenje oštećene stanice. Ovaj mehanizam mogu poremetiti delecije samog proteina p53 (što je slučaj u 40% glioblastoma) ili prekomjernom ekspresijom p53 inhibitora kao što su MDM2 i MDM4.

Poremećaji u putu tumor-supresora Rb1 javljaju se kod više od 75% pacijenata sa glioblastomima. Protein Rb1 blokira stanični ciklus te remećenje njegova rada može dovesti do neplaniranog napretka ciklusa. U glioblastomima, ovaj put se može narušiti izravnim mutacijama u genu *Rb1* koje ga čine nefunkcionalnim ili prekomjernom ekspresijom ciklin-ovisnih kinaza 4 (CDK4). Prekomjerna ekspresija CDK4 može se desiti izravno, njihovom amplifikacijom ili delecijom njihovog inhibitora CDKN2A (Belden i sur. 2011).

Osim ovih mutacija, identificirani su i neki dodatne promjene koje su zajedničke i primarnim i sekundarnim glioblastomima, kao što je gubitak heterozigotnosti na desatom kromosomu. Primarni glioblastomi često pokazuju gubitak cijelog kromosoma, dok je kod

sekundarnih eš i djelomi an gubitak, odnosno delecija dugog kraka kromosoma 10 (Kanu i sur. 2009). Ova je delecija vrlo zna ajna upravo zbog toga što poga a lokuse na kojima se nalaze geni za tumor-supresore. Tako er, neke od promjena koje omogu avaju migraciju stanica i njihovu invaziju u okolno tkivo su ekspresija promjenjenih molekula kadherina i integrina, preoblikovani citoskelet, druga iji sastav površinskih receptora itd. (Belden i sur. 2011). Upravo zbog uzajamne povezanosti i me usobne komunikacije, promjena u jednom signalnom putu odražava se i na sastavnice drugog puta s kojima prvi ostvaruje interakcije.

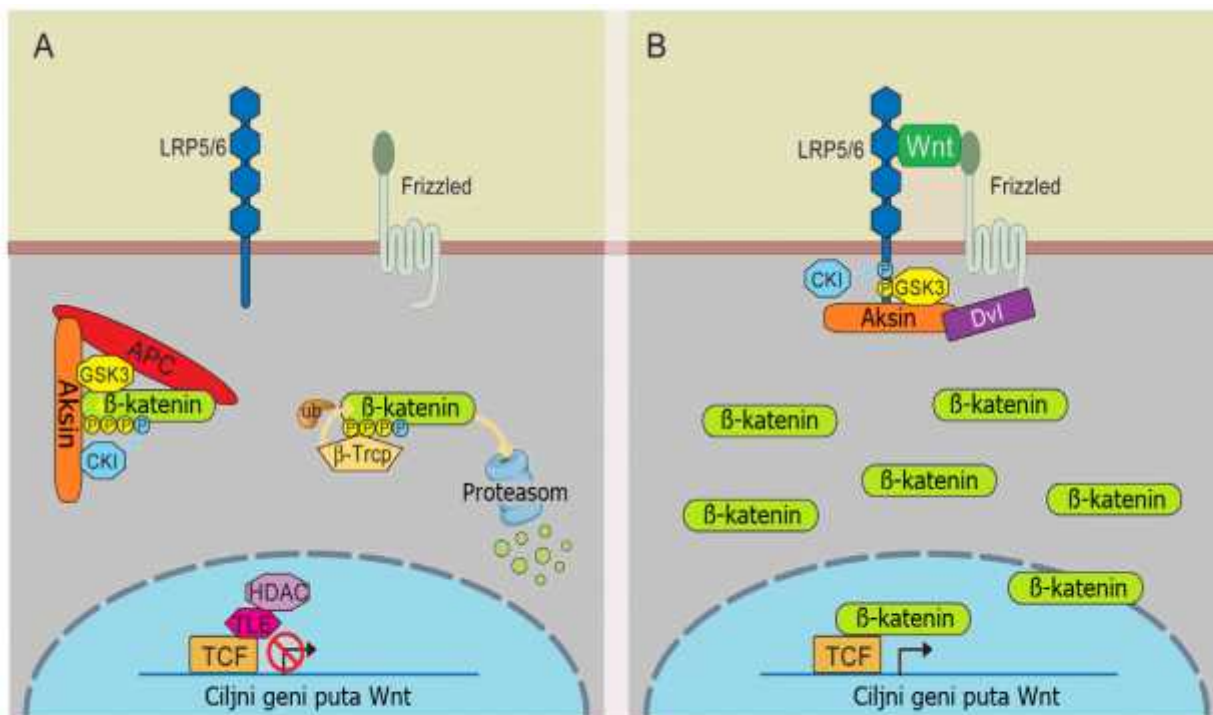
Kao i ve ina drugih tumora glijalnih stanica, i glioblastomi pokazuju veliku otpornost na radioterapiju i kemoterapiju a ak i kada su one uspješne, vrlo brzo dolazi do povratka tumora. Jedna od teorija o uzroku konstantnog vra anja tumora nakon lije enja je i ta da u tkivu glioblastoma postoje tumorske stanice s osobinama mati nih stanica (Walker i sur. 2011). Naime, u odraslom mozgu postoje populacije neuralnih mati nih stanica i progenitora glijalnih stanica a u glioblastomima i tumorske mati ne stanice koje predstavljaju samo mali dio populacije tumorskih stanica, ali imaju svojstvo samoobnavljanja kroz simetri ne i asimetri ne diobe, te diferencijacije stanica-k eri u neurone ili glija stanice (u ovom slu aju u astrocite) (Kanu i sur. 2009). U neuralnim mati nim stanicama aktivni su oni signalni putevi koji koji su ina e aktivni tijekom razvoja živ anog sustava, a me u njima se nalazi i signalni put Wnt. Ponovna aktivacija puteva koji obi no reguliraju samoobnavljanje, proliferaciju i preživljenje stanica tijekom razvoja, može doprinijeti nastanku i agresivnosti tumora kao što je glioblastom. U glioblastomima, izme u ostalog, dolazi i do poreme aja ekspresije molekula koje sudjeluju u signalnom putu Wnt te se pretpostavlja da njihova aktivacija doprinosi tumorigenezi (Alcantara Llaguno i sur. 2009).

1.2. Signalni put wnt

Geni signalnog puta Wnt zna ajni su kad se govori o mnogim važnim biološkim fenomenima u rasponu od razvoja organizma preko stani nog ponašanja uslijed niza bolesti, posebno raka (Nusse i Varmus 2012). Istraživanje ovog puta i njegove signalne kaskade zapo elo je davne 1982. godine kada su Nusse i Varmus u mišu otkrili gen za protein int-1, proto-onkogen klju an u nastanku tumora mlije nih žlijezda kasnije identificiran kao ve prije otkriveni gen kod vinske mušice nazvan Wingless (Wg). Tim saznanjem int-1 je preimenovan u Wnt-1 (Klaus i Birchmeier 2008).

Stani na signalizacija posredovana proteinima Wnt utječe na mnogobrojne stanične procese kao što su stanična proliferacija, apoptoza, morfologija i polarnost te konačne sudbine stanica. Svi ovi procesi od izuzetne su važnosti u odraslom organizmu za održavanje homeostaze tkiva i niša matičnih stanica. No, Wnt put ipak ponajprije spominjemo kad govorimo o embrionalnom razvoju organizma gdje on ima ključnu ulogu u normalnom stvaranju središnjeg živčanog sustava: prvo neuralne ploče i cijevi, a poslije i mozga, leđne moždine te senzornih i motornih neurona. Osim razvoja živčanog sustava, sudjeluje i u razvoju krvožilnog sustava te pomaže pri održavanju koštane mase u odraslom organizmu putem regulacije apoptoze koštanih stanica osteoblasta (MacDonald i sur. 2009, Peña-Šlaus 2010).

Proteini wnt pokreću dva zasebna puta signalizacije od kojih je puno istraženiji onaj u kojem glavnu ulogu ima β -katenin (wnt/ β -katenin signalni put) (Slika 2.). On je ujedno, zajedno sa ostalim faktorima, ključan u aktivaciji transkripcije gena čiji su produkti važni u embrionalnom razvoju i životu odrasle stanice. Sama signalizacija započinje proteinima Wnt koji služe kao izvanstanične signalne molekule. Njihova sekvenca je jako očuvana kod svih višestaničnih organizama a sastoji se od 350-400 aminokiselina s velikim udjelom cisteina (Raviandranath i sur. 2008, MacDonald i sur. 2009). Signalna kaskada započinje kada se vezanjem Wnt-a aktiviraju receptori na staničnoj površini koji dalje prenose signal. U ovom prijenosu sudjeluju dvije vrste receptora: Frizzled (Fz) te dva proteina vezana uz LDL receptor: LRP5 i LRP6. Frizzled je transmembranski receptor koji sedam puta prelazi membranu te osim u ovom sudjeluje i u mnogim drugim signalnim putevima. U genomu sisavaca nalazi se 10 gena za Fz koji se međusobno razlikuju po svojoj sposobnosti aktivacije puta wnt. Što se tiče dvaju LRP receptora, LRP6 ima dominantniju ulogu i ključan je u embriogenezi, dok je LRP5 važan u održavanju homeostaze odraslih kostiju (MacDonald i sur. 2009).



Slika 2. Signalni put wnt. A) U odsutnosti molekula Wnt, signalni put je neaktivan: degradacijski kompleks sačinjen od aksina, APC, GSK3 i CK1 modificira i razgrađuje β -katenin; nema transkripcije ciljnih gena. B) put wnt je aktivan: stabilni β -katenin ulazi u jezgu, veže transkripcijski factor i počinje transkripcija ciljnih gena. (Preuzeto i prilagođeno prema MacDonald i sur. 2010.)

Ključna molekula ovog puta, kako mu i samo ime kaže, je β -katenin. Aktivacija transkripcije ciljnih gena u putu wnt jedna mu je od esencijalnih uloga te je ovisna o njegovoj stabilnosti. Signalni put aktivira se samo ako su prisutni wnt proteini. U suprotnom, u citoplazmi se konstantno stvara degradacijski kompleks koji se sastoji od aksina, proteina APC te enzima CK1 i GSK3 koji na sebe veže β -katenin te ga tako razgrađuje. Shodno tome, protein APC djeluje kao tumor supresor te njegove mutacije uvelike utječu na regulaciju β -katenina (Polakis 2000). APC zajedno sa aksinom stvara potporanj za vezanje β -katenina kako bi ga dovele u povoljan položaj za uinkovitu fosforilaciju kinazama u to no odre enom redoslijedu (MacDonald i sur. 2009, Cadigan 2008). Kinaze iz ovog multiproteinskog kompleksa, GSK3 i CK1, fosforiliraju etiri serina i treonina u amino-terminalnom dijelu β -katenina i tako stvaraju vezno mjesto za enzim E3 ubikvitin-ligazu te na kraju proteasom razgrađuje takav fosforilirani i ubikvitirani β -katenin. Odsutstvom β -katenina nema njegove akumulacije u jezgri niti aktivacije ciljnih gena (MacDonald i sur. 2009).

Signalizacija puta wnt zahtijeva obje vrste receptora, i Frizzled i LRP6 (ili LRP5). Fosforilacija LRP6 inducirana proteinom wnt je ključna u aktivaciji receptora. I LRP5 i LRP6 imaju pet ponavljajućih PPPSPxS motiva (P-prolin; S-serin ili treonin; x-varijabilni aminokiselinski ostatak) koji su ključni za funkcioniranje LRP6 i koji su prenosivi na heterologni receptor što rezultira konstitutivnom β -katenin signalizacijom. Upravo ovi fosforilirani motivi služe kao usidrenje za aksinski kompleks, regrutiraju i aksin na LRP6 uslijed wnt aktivacije.

Kada se protein wnt veže na Fz, aktivira se signalna kaskada. Aktivirani Fz dolazi u interakciju sa pomoćnim receptorom LRP6 ili LRP5 te taj novonastali kompleks na sebi sa citoplazmatske strane veže protein Dishevelled (Dvl). Dvl dolazi u izravan kontakt sa Fz što je ključno za fosforilaciju njegovog koreceptora koju provode isti enzimi koji su zaslužni za modifikacije β -katenina – kinaze GSK3 i CK1 (Zeng i sur. 2005). Kada je fosforiliran, LRP6 se aktivira te se za njega veže i aksin te tada oni više ne mogu tvoriti degradacijski kompleks i time se i razina β -katenina stabilizira te β -katenin ne prolazi kroz spomenute modifikacije, ne razgrađuje se te se nakuplja u citoplazmi te se potom premješta u jezgro (MacDonald i sur. 2009).

Kada se β -katenin nalazi u jezgri, veže se na određene transkripcijske faktore te tako sudjeluje kao pomoćnik u transkripciji. To su faktori iz TCF/LEF obitelji na koje se β -katenin veže jer sam nema DNA-veznu domenu pa mu je potrebna njihova (Arce i sur. 2006). Kada nema izvanstaničnog signala i kada je signalizacijski put utišan, transkripcijski faktori su vezani za protein-represore Groucho, odnosno kod ljudi TLE, te je zbog toga transkripcija ciljnih gena utišana (Ravindranath i sur. 2008).

Kada se u jezgri nakupi dovoljno β -katenina, on zamjenjuje protein TLE te se veže na transkripcijske faktore s kojima zajedno aktivira transkripciju ciljnih gena puta Wnt. Među ciljnim genima nalaze se brojni geni uključeni u procese razvoja, staničnu proliferaciju, stanične interakcije, migracije, morfologiju, apoptozu, stanični ciklus itd. Neki od tih gena su: protoonkogeni *c-jun* i *fra-1* (Mann i sur. 1999), gen za osteopontin važan za adheziju i migraciju stanica (Ravindranath i sur. 2008), geni za ciklin D1 i D2 (regulacija staničnog ciklusa) (Peinařlaus 2010), *c-Myc* (gen za transkripcijski faktor koji regulira ekspresiju mnogih gena uključeni u npr. apoptozu, stanični ciklus, rast, replikaciju DNA i dr. (Peinařlaus 2010) te mnogi drugi geni. Do danas, njihov broj je porastao na više od 50 gena proučavanih u različitim organizmima (Ravindranath i sur. 2008).

Uzimaju i u obzir važnost i ulogu svih ovih genskih produkata kontroliranih putem wnt, jasno nam je da njegova konstanta ili povišena aktivacija može dovesti do raznih patoloških stanja. Nepravilna signalizacija proteinima wnt tijekom embrionalnog razvoja može uzrokovati poremećaje u stvaranju tkiva i organa u razvoju. Kod odraslih, može poremetiti homeostazu, posebice u tkivima koja sadrže niše matičnih stanica (Arce i sur. 2006). Mutacije ili bilo kakve druge promjene u nekoj od sastavnica signalnog puta Wnt, mogu dovesti do nastanka nasljednih bolesti, osteoporoze te brojnih oblika tumora, a sve to se dovodi i u vezu sa kardiovaskularnim i neurološkim bolestima (MacDonald i sur. 2009, Polakis 2000).

Već od samog otkrića i početka istraživanja prvog proteina Wnt-1, kada je on identificiran kao produkt istoimenog onkogena, bila je jasna veza proteina s tumorima (Aoki i sur. 1999). Uz to, wnt je povezan s apoptozom koju može regulirati ovisno o okolišu u kojem se stanica nalazi i signalima koje iz njega prima. Iz toga je jasno da su pogreške u ovom putu povezane sa tumorigenezom u različitim tipovima tkiva, odnosno stanicama, među kojima su i stanice središnjeg živčanog sustava (Peinado-Šlaus i sur. 2014).

1.3. Protein Dishevelled (DVL)

Istraživanje puta wnt tijekom godina otkrilo je cijeli set gena i proteina koji imaju veće i manje uloge. U ovoj složenoj signalnoj kaskadi, protein Dishevelled (DVL) je ključan te se njegova uloga u wnt signalizaciji nalazi na samom početku. Članovi ove proteinske obitelji smatraju se ključnom točkom za grananje puta u tri različite stanične rute: kanonski put, nekanonski te Wnt-Ca²⁺ put. Posljednja istraživanja su prikazala mehanizam kojim DVL aktivira nizvodne puteve i o kojima će biti riječ dalje u tekstu (Wharton 2003, Astudillo i Larrain, 2014).

DVL igra ključnu ulogu kod križanja triju gore spomenutih signalnih kaskada. Kanonski Wnt signalni put je jedan od osnovnih mehanizama staničnog signaliziranja, bitan u embrionalnom razvoju te održanju homeostaze odraslog tkiva visoko opremljen u animalnom carstvu. Aktivira se vezanjem jednog od 19 liganda identificiranih u ovjeku, na specifični receptor te se putem nekoliko citoplazmatskih komponenti signal prenosi dalje (Logan i Nusse 2004). Kao što je opisano u prethodnim poglavljima, tok signal ovisi o razini β -katenina u citoplazmi a DVL se smatra njezinim glavnim regulatorom koji štiti β -katenin od degradacije.

Vežanje Wnt molekule na membranski receptor aktivira DVL (Wallingford i Habas 2005) te se on tada regrutira na membranu i dolazi u izravan kontakt sa Fz receptorom (Wong i sur. 2003). Ova interakcija je ključna za fosforilaciju ko-receptora Fz-a, LRP5/6 a događa se putem fosfokinaza GSK3 i CK1, istih onih enzima koji su odgovorni za fosforilaciju β -katenina. Fosforilacija aktivira LRP5/6 ko-receptor koji osim kinaza može vezati i Aksin na citoplazmatski rep LRP-a. S obzirom da Aksin koji je sada na plazmatskoj membrani više ne može biti dio degradacijskog kompleksa, kompleks se ne može ni stvoriti. Pokazano je također i da DVL može vezati Aksin i tako inhibirati njegovu aktivnost. Znači, primitak Wnt signala može pokrenuti nakupljanje Aksina ili na LRP5/6 ili na DVL vezan za Fz. To vodi nakupljanju β -katenina u citoplazmi, njegovoj translokaciji u jezgru te aktivaciji ciljnih gena (Yanfeng i sur. 2011, Logan i Nusse 2008).

DVL je multifunkcionalan fosfoprotein otkriven u *Drosophila melanogaster*. U *Drosophila* se eksprimira samo jedan gen *DVL* te je nužan za pravilan razvoj. Naprotiv, njegovi homolozi *DVL1*, *DVL2* i *DVL3* pronađeni su kod ovjeka i pokazuju visok stupanj homologije. Kod ovjeka, *DVL* je multigenska obitelj sa tri gena koja kodiraju za tri DVL proteina. *DVL1* je pozicioniran na lokusu 1p36, njegov protein je dugačak 695 aminokiselina, *DVL2* se nalazi na lokusu 17q21, protein mu je dugačak 736 aminokiselina dok se *DVL3* nalazi na lokusu 3q27 s proteinom dugim 176 aminokiselina. Eksperimenti u *knock-out* miševima su pokazali da svaki DVL protein kod sisavaca može funkcionirati kooperativno kao i samostalno, što ukazuje da DVL protein kod sisavaca mogu funkcionirati kao mreža s nekim zajedničkim karakteristikama (*Protein Knowledgebase*). *DVL2* je najčešći od sva tri opisana. Također, poznate su dvije izoforme humanog *DVL1* i dvije *DVL3* stvorene alternativnim prekrajanjem, dok je kod *DVL2* poznata samo jedna izoforma (Lee i sur. 2008).

Svi DVL proteini u svim vrstama posjeduju tri konzervirane domene: amino-terminalnu DIX (Dishevelled, Aksin), središnju PDZ (Postsynaptic density 95, Disc Large, Zonula occludens-1) i karboksi-terminalnu DEP (Dishevelled, Egl-10, Pleckstrin). Osim ove tri konzervirane domene, DVL također ima dvije konzervirane regije sa pozitivno nabijenim aminokiselinama. Prva se naziva osnovnom regijom i sastoji se od serinskih i treoninskih ostataka koji se protežu između DIX i PDZ domena, a druga je regija bogata prolinom, SH3 (*src* homology 3) vezna domena smještena nizvodno od PDZ (*Protein Knowledgebase*). Opisane su i strukture Dishevelleda te njegovih triju glavnih domena. Predložena peptidna struktura ima protein-protein interakciju te tako DVL služi kao adapterska molekula. Dillman i sur. (2013) smatraju da postoji i četvrta konzervirana domena u DVL koja se naziva dishevelled no njezina

funkcionalna važnost nije poznata. S obzirom na središnju ulogu u putu wnt, ne iznenađuje činjenica da domene DVL proteina imaju vezna mjesta za velik broj različitih proteina, uključujući i nekoliko kinaza. DVL proteini koriste različite domene kojima posreduju u kompleksnom prijenosu signala: DIX i PDZ su ključni za kanonični -katenin put, dok su PDZ i DEP ključni za PCP signaliziranje posredovano translokacijom iz citoplazme na membranu. Stani na zaliha dostupnog DVL-a je ograničena u smislu da aktivacija jednog puta odvaja DVL u različite stanične odjeljke i ga tako nedostupnim na drugim mjestima za aktivaciju drugih puteva, što znači da aktivacija kanonskog wnt puta nizvodno može utjecati na ne-kanonski put, i obrnuto (Wallingford i Habas 2005).

Iako uloga domena i regija DVL-a nije u potpunosti razjašnjena, poznato je da one međusobno reagira sa više od 50 veznih partnera u citoplazmi i jezgri. No, unatoč tome, Dvl nema poznatu enzimatsku aktivnost. Poznati mehanizam pozitivne regulacije aktivnosti Dvl-a je fosforilacija proteina, dok se vrlo malo zna o utjecaju njegovih posttranslacijskih modifikacija na aktivnost, stabilnost i regulatorni mehanizam. Unatoč tome, znamo da se vezanjem Wnt molekule na receptor inducira fosforilacija u glavnim regijama Dvl-a. Kinaze i drugi faktori uključeni u ove događaje kao pozitivni regulatori su kazein-kinaza 1 (CK1), kazein-kinaza 2 (CK2), PAR1 i -arestin. Fosfatne skupine se nalaze duž Dvl proteina, uključujući i konzervirane domene. Mehanizam negativne regulacije aktivnosti Dvl-a je poliubikvitinacija. Modificirani DVL se razgrađuje proteosomalno ili lizosomalno različitim ubikvitinilacijskim putevima. Protein fosfataza 2A (PP2A) je također uključena u regulaciju aktivnosti DVL. Može imati pozitivan ili negativan učinak, ovisno s kojom se subregulatornom domenom DVL-a veže (Jung i sur. 2013).

Kako je već u prethodnim poglavljima bilo govora, signalni put Wnt je ključan i u embriogenezi sisavaca. Mutacije mnogih *Wnt* gena kod miša dovele su do vrlo specifičnih razvojnih poremećaja. Ovaj put služi kao regulator mnogih procesa tijekom embriogeneze, uključujući i stanične uzorke pri razvoju tkiva, proliferaciju, diferencijaciju, mehanizam ustanične komunikacije, migraciju, apoptozu i dr. Put Wnt regulira normalan razvoj neuralne ploče i neuralne cijevi, a kasnije i mozga, leđne moždine te mnogih senzornih i motoričkih neurona. Uz neuralna tkiva, ključan je i za razvoj kardiovaskularnog sustava te fiziologije osteoblasta. Samim time, ulogu u ovim procesima ima i sam DVL. DVL aleli su prvi put pronađeni kod mutanata *Drosophila* koji su imali oštećene i prorijeđene periferne dlačice na krilima (Fahmy i Fahmy 1959). Po ovom opisu je i sad protein Dishevelled dobio ime. Alelni lokusi su kasnije opet

pronađeni isto kod vinske mušice, kada se pokazalo da je DVL važan segment za određivanje polarnosti embrija.

Odgovornost DVL-a kod za humane razvojne poremećaje dokazana je jedino za gene uključene u određene sindrome, kao što je naprimjer Schwartz-Jampel sindrom (Pizzuti i sur. 1996) te bolest Charcot-Marie-Tooth tipa 2A. Također, naglašava se da Dvl1 možda ima ulogu kao neuralni diferencijacijski faktor što ga čini odgovornim za neuroblastomatozne transformacije kao i da sudjeluje u u patogenezi 1p36 delecijanskog sindroma (Bedell i sur. 1996).

Mehanizam Wnt signalizacije je strogo kontroliran i smetnje u njegovoj signalnoj kaskadi impliciraju različite poremećaje kod ljudi. Mutacije u njegovim kodirajućim genima pronađene su kako u degenerativnim bolestima, tako i u raku. Mnogi tipovi tumora pokazuju visoku razinu β -katenina te je poznato da je njegova translokacija u jezgri ključna za onkogenu aktivnost. Dokazano je, dakle, da konstitutivna aktivacija Wnt puta može dovesti do raka a protein DVL, kao njegova ključna komponenta, došao je pod povećalo kada se radi o istraživanju nastanka tumora. Do sada su uočene visoke razine DVL-a u različitim tipovima tumora, uključujući rak pluća, prostate, dojke, rak ploštih epitelnih stanica grlića maternice te gliome (Zhao i sur. 2010, Nagahata i sur. 2003). Međutim uloge individualnih DVL proteina u tumorima te je li prekomjerna ekspresija povezana s njima, još uvijek su slabo definirane.

Funkcionalne posljedice ekspresije proteina iz obitelji Dishevelled u nastanku tumora još uvijek nisu u potpunosti jasne. Većina radova upućuje na prekomjernu ekspresiju i amplifikaciju, dok neki od njih čak upućuju i na delecije DVL lokusa. Od posebnog interesa kada se istražuje veza DVL-a i tumora je proces koji je odgovoran za invaziju i metastaze tumora, tzv. epitelno-mezenhimska tranzicija (EMT). Pojava ovog procesa tijekom napretka tumora je vrlo slična razvojnog procesu što donekle pojašnjava mehanizme koji upravljaju metastazama gdje neinvazivne tumorske stanice postaju pokretljive te se šire na mjesta udaljena od primarnih. Istraživanja su pokazala povezanost puta wnt sa EMT te da su svi homolozi DVL-a uključeni u nastanak metastaza (Zeljko i sur. 2011, Li i sur. 2013). Istraživanja na ovom polju napreduju vrlo brzo te se predviđa da će komponente puta wnt uskoro biti relevantni biomarker za bolju dijagnozu i terapiju. Još uvijek je rano za postavljanje DVL-a kao terapijske mete, no uzorci njegove ekspresije do sada pronađeni u tumorima vrlo jasno upućuju u kojem smjeru buduća istraživanja moraju ići.

1.4. Lan ana reakcija polimerazom

Lan ana reakcija polimerazom (Polymerase chain reaction; PCR), uz kloniranje i sekvenciranje, najznačajniji metodološki izum u modernoj molekularnoj biologiji. Od tri navedene, PCR je najstarija i u praksi najraznovrsnija metoda. Prvi put je predložena još ranih 70-ih godina kada su H. Gobind Khorana i njegovi kolege osmislili strategiju za kemijsku sintezu gena. Međutim, ideja nikad nije realizirana s obzirom da tada još nije otkrivena termostabilna DNA polimeraza i da sinteza oligonukleotidnih po etnicima još nije postojala u praksi. Tek 15 godina kasnije, nezavisno od Khorane, Kary Mullis zajedno sa kolegama iz Cetus korporacije iznosi metodu *in vitro* amplifikacije samo jedne kopije gena sisavaca koristeći Klenowljev fragment DNA polimeraze iz bakterije *Escherichia coli* (Mullis i sur. 1986).

Međutim, unatoč svemu, PCR bi vrlo vjerojatno ostao samo nespretna laboratorijska metoda da nije bilo otkrića termostabilne DNA polimeraze izolirane iz bakterije *Thermus aquaticus* što je uvelike povećalo učinkovitost PCR-a te otvorilo vrata k automatizaciji ove metode. Do kraja 80-ih godina, kloniranje više nije bilo jedini način umnažanja gena. Naime, DNA sekvenciranje je uznapredovalo te je time PCR postao prekretnica u genetici koja i molekularnoj analizi. Uz svoju jednostavnost, PCR je i robustan, brz, i najvažnije od svega, vrlo fleksibilan. Veliki broj varijacija ove metode opisan je u mnogim znanstvenim časopisima i knjigama.

Osnovne komponente PCR-a su: Termostabilna DNA polimeraza, par sintetskih oligonukleotida, deoksinukleozid trifosfati (dNTP-ovi), divalentni kationi, pufer za održavanje pH te, naravno, DNA kao kalup za umnažanje.

Termostabilne DNA polimeraze izolirane su iz dvaju vrsta organizama: termofili među kojima i hipertermofili među kojima eubakterija Archaeobacteria, ije najčešće polimeraze podsjećaju na DNA polimeraze iz mezofilnih bakterija; te termofilnih Archaea, ije glavne polimeraze pripadaju obitelji polimeraza. *T. aquaticus* organizam je iz Archaea termofilne obitelji. *Taq* (*T. aquaticus*) DNA polimeraza, prva je izolirana i najbolje istražena od svih termostabilnih DNA polimeraza te je glavni radni "stroj" u većini laboratorija. U samom PCR-u, ove polimeraze služe za katalizu sinteze DNA ovisne o kalupu. Danas je dostupan veliki broj enzima koji mogu varirati u svojoj preciznosti, specifičnosti, učinkovitosti te sposobnosti da sintetiziraju velike fragmente DNA. Za rutinske reakcije, *Taq* polimeraza (0.5-2.5 jedinica po standardnoj reakciji od 25-50 µl) je najčešći i

izbor. Specifična aktivnost većine komercijalno dostupnih *Taq* polimeraza je ~80000 jedinica/mg enzima.

Par sintetskih oligonukleotidnih po etnica vjerojatno je najvažniji parametar metode PCR te je njegov precizan dizajn prijeko potreban kako bi se osigurali točno željeni produkti u velikoj količini, kako bi se spriječila amplifikacija neželjenih sekvenci te kako bi se olakšala kasnija manipulacija dobivenim produktima (Sambrook i Russell, 2001). Više o samom dizajnu po etnica bit će rečeno kasnije u ovom radu.

Standardni PCR sadrži ekvimolarne količine svakog od dNTP-ova: dATP, dTTP, dCTP i dGTP, nužnih za sastavljanje produkta po uzoru na kalup. Preporučene koncentracije svakog od deoksinukleotida za reakcije *Taq* polimerazom su od 200 do 500 μM .

Sve termostabilne polimeraze za svoju aktivnost zahtijevaju slobodne divalentne katione, najčešće Mg^{2+} . Neke od polimeraza mogu raditi s nešto manjom učinkovitošću i sa puferima koji sadrže Mn^{2+} , dok su kalcijevi ioni neučinkoviti. S obzirom da i dNTP-ovi i oligonukleotidi vežu magnezij, molarna koncentracija ovih kationa mora biti veća od molarne koncentracije fosfatnih grupa u dNTP-ovima i po etnicama zajedno, stoga je nemoguće preporučiti neku jedinstvenu koncentraciju optimalnu za sve uvjete.

Pufer za odražavanje pH koji se najčešće koristi u standardnom PCR-u je Tris-Cl pufer, pH između 8.3 i 8.8 zadan na sobnoj temperaturi koncentracije 10mM. Monovalentni kationi su često dio sastava pufera te su dobri za amplifikaciju segmenata DNA manjih duljina od 500 pb. Povećanje koncentracije KCl-a poboljšava prinos kraćih DNA segmenata.

DNA koja služi kao kalup i sadrži ciljne sekvence koje želimo umnožiti može se dodati u PCR u jednolančanim ili dvolančanim obliku, dok se kružna DNA umnaža manje učinkovito od linearne. Iako veličina kalupa nije ključna, amplifikacija sekvenci na velikim odsjecima može se pojačati rezanjem kalupa restriktivnim enzimima koji ne cijepaju ciljne sekvence. Pri optimalnim uvjetima, PCR zahtijeva samo jednu kopiju ciljne sekvence, iako u reakciji u praksi obično ide i do nekoliko tisuća kopija ciljne DNA.

Optimizacija uvjeta PCR metode je dugotrajan i zahtjevan proces u kojem je potrebno optimizirati tri glavna elementa reakcije: 1) denaturaciju DNA kalupa, 2) spajanje po etnica sa kalupom (eng. annealing) te 3) produljenje po etnica polimerazom.

Dvolan ani DNA kalupi denaturiraju se na temperaturi koja je određena njihovim G-C sastavom. To je njihova temperatura taljenja, odnosno temperatura potrebna za pucanje veza u nukleotidnim parovima. Što je veći G-C udio, to je potrebna viša temperatura. Što je veća DNA molekula, dulje je vrijeme potrebno da se lanci u potpunosti odvoje na odabranoj temperaturi. Ako je temperatura preniska ili vrijeme prekratko, denaturiraju se samo regije kalupa bogate AT ponavljanjima. Ukoliko je PCR katalizirana *Taq* polimerazom, denaturacije se izvodi na temperaturama od 94 do 95°C, što je najviša temperatura koju enzim može izdržati tijekom 30 ili više ciklusa bez da mu ona naštetiti. U prvom ciklusu PCR-a, denaturacija traje 5 minuta kako bi se povećala vjerojatnost potpunog razdvajanja dugih molekula DNA.

Temperatura potrebna za sparivanje po etnicama s kalupom ključna je u cijelom procesu. Ukoliko je ona previsoka, oligonukleotidne po etnice slabo će prijanjati te će prinos produkta biti vrlo nizak. Ukoliko je ta temperatura preniska, doći će do nespecifičnog sparivanja po etnicama sa kalupom što će rezultirati umnažanjem neželjenih segmenata DNA. Sparivanje se obično izvodi na temperaturi nekoliko stupnjeva niżej od temperature taljenja na kojoj oligonukleotidne po etnice disociraju sa svojih kalupa. Najbolji način za optimizaciju uvjeta je izvođenje niza pokusnih reakcija s temperaturama u rasponu od 2 do 10°C nižih od temperature taljenja izračunate za po etnice.

Produljivanje oligonukleotidnih po etnica se izvodi pri temperaturi optimalnoj za sintezu DNA kataliziranu termostabilnom polimerazom, što je u slučaju *Taq* polimeraze između 72 i 78°C. U prva dva ciklusa produljenje jedne po etnice ide izvan sekvence komplementarne veznom mjestu druge po etnice. U sljedećem ciklusu nastaju prve molekule čija duljina odgovara duljini segmenta DNA određene veznim mjestima po etnica. Od trećeg ciklusa nadalje, ovaj segment DNA se umnaža geometrijski, dok se dulji amplifikacijski produkti nakupljaju aritmetički. U posljednjem ciklusu mnogi istraživači koriste vrijeme produljivanja tri puta dulje od posljednjeg ciklusa PCR-a kako bi dali vremena da se dovrše svi amplificirani produkti.

Broj ciklusa potreban za amplifikaciju ovisi o broju kopija kalupa DNA prisutnih u početnoj reakciji i u inkubitosti produljenja po etnica i amplifikacije. Jednom kad je geometrijska faza uspostavljena, reakcija se nastavlja onoliko dugo koliko ju ograničava dostupnost jedne od komponenti. U ovoj točki, prinos specifičnih amplificiranih produkata bi trebao biti maksimalan dok bi prisutnost nespecifičnih produkata trebala biti jedva vidljiva. To je obično slučaj nakon 30 ciklusa u reakcijama koje sadržavaju $\sim 10^5$ kopija ciljane sekvence (Sambrook i Russell 2001).

1.5. Mikrosatelitni biljezi

U ljudskom genomu nalazi se velika količina segmenata DNA koji na prvi pogled nemaju funkciju. Ti dijelovi DNA sadrže varijacije i polimorfizme koji su karakteristični za svaku pojedinu jedinku. Oko 30% tih dijelova DNA uređeno je u kratke uzastopne ponavljanje sekvence koje se nazivaju mikrosatelitima. Procjenjuje se da postoji između 55 000 i 100 000 mikrosatelitnih ponavljanja u ljudskom genomu, iz čega proizlazi da se po jedan biljeg nalazi na svakih 100 000 parova baza (Koreth i sur, 1996). Mikrosateliti se stabilno nasljeđuju, visoko su očuvani s jedne generacije na drugu, jedinstveni su za pojedince, te su jednaki u različitim stanicama istog pojedinca. Također, nalaze se u mnogim važnim genetskim lokusima što omogućuje korištenje mikrosatelita kao biljega za razne bolesti, daju i informacije o statusu pojedinog gena, pogotovo kod tumora. Time se dobiva uvid u replikaciju, popravak i mutacije eukariotske DNA.

Ponavljanje sekvence su često jednostavne i sastoje se od dva do četiri nukleotida (di-, tri- i tetranukleotidna ponavljanja) i mogu se ponavljati 10 do 100 puta. Najčešća ponavljanja u ljudskom i drugim genomima su CA ponavljanja. S obje strane ponavljanje sekvence nalaze se regije "neuređene" DNA, tzv. bočne regije. Bočne regije su bitne jer omogućuju dizajniranje mjesno-specifičnih primaka po etnicima pomoću kojih se mikrosateliti mogu umnožiti PCR-om. Zbog duljine (od 30 do 50 parova baza) neuređene DNA, vjerojatnost nalaženja dva ista takva odsjeka DNA u genomu je veoma mala što omogućava visoku specifičnost umnožavanja.

Zbog svoje sveprisutnosti, ko-dominantnog nasljeđivanja, iznimno velikog polimorfizma i visoke specifičnosti u PCR-u, mikrosateliti imaju sve važniju ulogu kao genski biljezi. Upotrebljavaju se za mapiranje gena, pozicijsko kloniranje, u tumorskoj biologiji, genetici, populacijskoj i osobnoj identifikaciji. Mikrosateliti i njihova analiza promijenili su procjenjivanje genetičkih abnormalnosti tako što su omogućili ili razvoj reproducibilne i povoljne metode za *screening* genskih mutacija koje sudjeluju u nastajanju tumorskih i ne-tumorskih oboljenja.

2. Cilj istraživanja

S ciljem boljeg razumijevanja nastanka i razvoja glioblastoma, proučavaju se molekularni putevi koji sudjeluju u staničnim procesima, posebice oni koji su odgovorni za transformaciju normalne stanice. Među njima je i signalni put wnt koji je jedan od ključnih puteva za stanicu, a njegovo neispravno funkcioniranje dovodi do nastanka brojnih tumora.

Cilj ovog rada je optimizirati uvjete metode lansirane reakcije polimerazom (PCR) za umnažanje mikrosatelitnih biljega za gen *DVLI*. Vjerujemo da su genetičke promjene gena *DVLI* uključene u nastanak glioblastoma te da će se u ovako optimiziranim uvjetima reakcije umnožiti vrlo specifični biljezi kojima će se odrediti mikrosatelitna nestabilnost i gubitak heterozigotnosti gena *DVLI*. Tako ćemo utvrditi točne parametre za uspješno odvijanje PCR-a za umnažanje mikrosatelitnih biljega D1S468 i D1S243 za gen *DVLI*.

3. Materijali i metode

3.2. Uzorci tkiva

Dvadeset i jedan uzorak tkiva glioblastoma prikupljen je na Klinici za neurokirurgiju Klini kog bolni kog centra „Sestre milosrdnice”, Zagreb, Hrvatska. Svi tumori su klasificirani od strane patologa prema kriterijima Svjetske zdravstvene organizacije (WHO), u glioblastom IV. Eti ki odbor je odobrio istraživanje, a pacijenti su potpisali informirani pristanak. Od ukupnog broja uzoraka, bilo je 9 muškaraca i 12 žena. Dob pacijenata kretala se izme u 30 i 68 godina, što se može vidjeti u Tablici 1. Kao kontrola poslužila nam je konstitutivna DNA iz krvi svakog od pacijenata.

Tablica 1. Podaci o uzorcima tkiva glioblastoma (M – muškarac, F – žena).

Uzorak	Dob pacijenta (u godinama)	Spol pacijenta
T4	68	M
T10	56	M
T14	54	F
T23	77	F
T27	60	M
T39	56	F
T40	31	M
T42	71	F
T50	56	F
T76	38	M
T102	59	F
T139	54	M
T502	39	F
T503	53	F
T505	55	M

T508	68	F
T509	37	F
T510	34	F
T513	30	M
T515	65	F
T516	61	M

Pacijenti uključeni u istraživanje nisu bili podvrgnuti drugim onkološkim metodama liječenja (radijacija, kemoterapija). Uzorci su uzimani za vrijeme kirurškog zahvata i odmah pohranjivani na -70°C. Uzorci krvi uzeti su prije operacije ili za vrijeme kontrolnih pregleda te su pohranjivani uz antikoagulans EDTA do korištenja na -20°C.

3.3. Izolacija DNA iz tkiva tumora

Izolacija DNA iz tumorskog tkiva je napravljena metodom ekstrakcije fenolom i kloroformom (Sambrook i sur. 1989). Od tkiva je odvojeno približno 0,5g mase tumora te je preneseno u Eppendorf epruvetu od 2 ml. Dodan je 1 ml pufera za ekstrakciju (10mM TrisHCl, pH 8,0; 0,5% Tween) i proteinaza K (Promega, USA) u konačnoj koncentraciji 20 mg/ml. Smjesa se inkubirala tijekom noći na 37°C.

Na smjesu je dodan jednak volumen fenola. Nakon laganog okretanja smjesa je centrifugirana na 10 000 x g, 15 minuta pri sobnoj temperaturi. Gornji vodeni sloj prenesen je u istu epruvetu i na taj volumen dodano je pola volumena fenola i pola volumena kloroforma, slijedilo je ponovno lagano mješanje i centrifugiranje na 10 000 x g, 15 min na sobnoj temperaturi. Vodeni sloj je ponovno prenesen u istu epruvetu i na njega je dodan jednak volumen kloroforma, te je ponovljen postupak i centrifugiranja smjese pri istim uvjetima. Izdvojen je vodeni sloj i na njega je dodano 2,5 volumena apsolutnog etanola. Nakon toga je DNA ostavljena preko noći na -20°C, te centrifugirana 15 minuta, 14 000 x g na +4°C. Supernatant je odstranjen, a talog osušen i otopljen u TE puferu (engl. *Tris-EDTA*: 10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 7,6).

3.4. Izolacija DNA iz periferne krvi

Genomska DNA izolirana je iz leukocita periferne krvi metodom isoljavanja (Miller i sur., 1988). Volumenu uzorka periferne krvi dodana su tri volumena pufera za lizu eritrocita, RCLB (engl. *Red-cells lysing buffer*: 10 mM Tri, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM NaCl, pH 7,6). Tako pripremljen uzorak ostavljen je na ledu 15 minuta, uz povremeno lagano miješanje. Uzorak se potom centrifugirao (Eppendorf 5810 R) na 800 x g, 10 minuta, pri +4 °C. Nakon centrifugiranja supernatant s liziranim eritrocitima je bačen, a talog leukocita resuspendiran je u RCLB puferu i centrifugiran pri istim uvjetima. Ovaj korak je ponavljan sve dok se talog nije oistio od ostataka eritrocita. Na površini talog leukocita dodan je SE pufer (engl. *sodium-EDTA*: 75 mM NaCl, 25 mM Na_2EDTA , pH 8,0), 10% otopina natrij-dodecil sulfata, SDS (engl. *sodium-dodecylsulphate*) i Proteinaza K (Promega, USA) koncentracije 20 mg/ml. Smjesa je ostavljena preko noći pri 37 °C.

Taloženje proteina i ostataka stanica vršilo se isoljavanjem pomoću 5 M otopine NaCl. Na jedan volumen uzorka dodana je 1/3 volumena NaCl, smjesa je dobro promiješana i centrifugirana (Eppendorf 5417 R) 15 minuta, 800 x g, na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja supernatant se odvojio od taloga i po potrebi još jednom centrifugirao. Na površini supernatant dodan je jedan volumen 2-propanola. DNA je istaložena laganim okretanjem epruvete, a potom isprana u 70% ledenom etanolu i otopljena u TE puferu (engl. *Tris-EDTA*: 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,6).

3.5. Određivanje koncentracije DNA

Koncentracija izolirane DNA određivana je mjerenjem apsorbancije na NanoDrop spektrofotometru (Thermo Scientific, USA). Mjerena je apsorbancija DNA pri valnim duljinama od 260 nm (apsorpcijski maksimum nukleinskih kiselina) i 280 nm (apsorpcija aromatskih aminokiselina proteina i peptida, te svih spojeva s aromatskim prstenom).

Apsorbancija na 260 nm koristila se za izračunavanje koncentracije, jer je poznato da je pri $A_{260}=1$ koncentracija genomske DNA 50 µg/ml. Za provjeru čistote DNA uzorka služio je omjer apsorbancije na 260 i 280 nm. Uzorak DNA je zadovoljavajući čist ako je omjer $A_{260}/A_{280}=1,6-1,9$.

3.6. Umnažanje DNA lananom reakcijom polimeraze

Po etnice za lananu reakciju polimerazom za naše ciljane mikrosatelitne biljge D1S468 i D1S243 (Tablica 2.) preuzeli smo s web stranice Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (National Center for Biotechnology Information; NCBI), Bethesda, SAD (Slika 3.). To su nukleotidna ponavljanja koja se protežu na 18 - 22 parova baza. U genomu uvijek ovi mikrosateliti pokazuju polimorfnost te se na osnovi tog uočenog polimorfizma mogu u heterozigotnih ili informativnih osoba vizualizirati pojedini aleli gena *DVLI*. Prilikom optimizacije uvjeta PCR-a varirali smo koncentraciju kalupa DNA, po etnice, Mg^{2+} . Također su optimizirane temperature pojedinih koraka reakcije.



Slika 3. Početna web stranica Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (NCBI).

Tablica 2. Slijed korištenih početnica

Naziv biljga	Slijed početnica u smjeru 5' -> 3'	
D1S468	1. početnica	TTAACCGTTTTGGTCCTACC
	2. početnica	CTCTGACCAGCATTAAGATTC
D1S243	1. početnica	CACACAGGCTCACATGCC
	2. početnica	GCTCCAGCGTCATGGACT

Reakcija umnažanja izvedena je u ukupnom reakcijskom volumenu 25 μ l. Reakcijska smjesa sadržavala je:

- genomsku DNA 200-400 ng
- par oligonukleotidnih po etnica (10 μ M) (Gorea, Hrvatska)
- smjesu deoksiribonukleotida (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 2,5 mM) (Eppendorf, Germany)
- 10 x PCR pufer (Agilent Technologies, SAD)
- PicoMaxx High Fidelity DNA polimeraza (5 U/ μ l) (Agilent Technologies, SAD)

Kona ni volumeni sastojaka smjese prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Volumeni sastojaka smjese u jednoj lančanoj reakciji polimerazom.

Sastojak smjese	Volumen (μl)
10 x PCR pufer	2,5
2,5 mM dNTP	0,2
10 μ M po etnica 1	0,5
10 μ M po etnica 2	0,5
PicoMaxx polimeraza	0,5
Genomska DNA	0,5
Voda	20,3

Reakcija umnažanja odvijala se u stroju za lan anu reakciju polimerazom (Gene Amp PCR System 2400, Perkin Elmer). Optimizacija i sami uvjeti bit e detaljno prikazani u poglavlju Rezultati.

3.7. Elektroforeza DNA na agaroznom gelu

Elektroforeza u agaroznom gelu korištena je za provjeru rezultata umnažanja lan anom reakcijom polimerazom.

Korišten je 1% agarozni gel u 1xTAE puferu (engl. *Tris-acetate-EDTA*: 0.045M Tris-acetate, 0.001M EDTA, pH8.0). Zagrijavanjem agaroz se otopila, te joj je dodano 4 µl otopine etidij-bromida (10mg/ml) na 50 ml gela. Dovoljno ohla ena agaroz se izlila u pripremljenu kadu za elektroforezu. Polimerizacija je trajala 15-20 minuta.

Uzorci su nanošeni u jažice agaroznog gela uz prethodno miješanje sa puferom za nanošenje uzoraka (engl. *loading buffer*:). Za određivanje veličina razdvojenih DNA vrpca, na gel se uvijek nanosio i molekularni biljeg poznatih molekularnih masa (BioLabs, New England).

Elektroforeza se odvijala pod stalnim naponom od 120 V, a trajanje je ovisilo o tome koje smo fragmente DNA željeli provjeriti. Za provjeravanje uspješnosti lansirane reakcije polimerazom elektroforeza je trajala 20 minuta. Nakon završene elektroforeze DNA fragmenti su vizualizirani pomoću UV-transiluminatora.

3.8. Dodatne analize umnožene DNA Spreadex-gelom

Dodatne analize amplificirane DNA izvedene su pomoću sustava za elektroforezu SEA 2000 (Elchrom Scientific, Švicarska). Za analizu uzoraka korišteni su Spreadex EI 400 Mini gelovi (Elchrom Scientific, Švicarska). Ti gelovi su proizvedeni tako da imaju ograničenu veličinu fragmenata koje propuštaju u gel, pa fragmenti veći od 400 parova baza ne mogu ući u gel. Elektroforeza se odvijala 90 minuta pri temperaturi od 55°C pod stalnim naponom od 120 V. Za određivanje veličina razdvojenih DNA vrpca, na gel se nanosio i molekularni biljeg od 100 parova baza (BioLabs, New England). Nakon završetka elektroforeze gelovi su bojani bojom Sybr gold (Molecular probes, SAD), vizualizirani pomoću UV-transiluminatora (λ=260 nm) i fotografirani digitalnom kamerom.

4. Rezultati

4.1. Koncentracija i kvaliteta izolirane DNA iz glioblastoma i krvi

Uzorci tkiva glioblastoma sakupljeni nakon operacije pacijenata i klasificirani prema kriterijima WHO, obrađeni su na način da je iz njih prvo izolirana DNA prije opisanim metodama. Paralelno s izolacijom iz tkiva tumora, obavili smo i izolaciju kontrolne DNA iz periferne krvi te smo tako dobili 21 par uzoraka DNA koje smo označili slovima T (tkivo tumora) i OT (periferna krv). Nakon izolacije, odredili smo koncentraciju DNA otopljene u puferu spektrofotometrom Nanodrop te dobili rezultate prikazane u Tablici 4.

Tablica 4. Koncentracije izolirane DNA iz tkiva tumora i periferne krvi.

Broj uzorka	Koncentracija DNA (ng/μl)	
	T	OT
4	202,2	167,7
10	117	184,8
14	94	114
23	149	81,6
27	96	114
39	148,1	74,4
40	61,4	64,4
42	175	182
50	372	60,26
76	289	196
102	343	230
139	329	179,97
502	1324,3	254
503	987,1	155
505	2781	321
508	262,1	100,4

509	3299	360
510	302	332,4
513	2989,6	256,4
515	1265,4	321,2
516	1588,4	333,2

(T – tkivo tumora; OT – periferna krv)

Kako je vidljivo iz tablice, koncentracije DNA izolirane iz tumora bile su višestruko puta veće od koncentracija DNA iz krvi, stoga smo DNA iz tkiva tumora prije provjere PCR-om razrijedili u TE puferu dok nismo dobili približne koncentracije svakog para.

Koncentracija izolirane DNA je određena putem omjera 260/280. Nakon određivanja koncentracija DNA, uzorke smo pripremili za analizu PCR-om, odnosno umnažanje željenog odsjeka DNA. Reakcije su izvršene sa smjesom prije opisanog sastava.

PCR-om smo umnožili genske biljege D1S468 i D1S243.

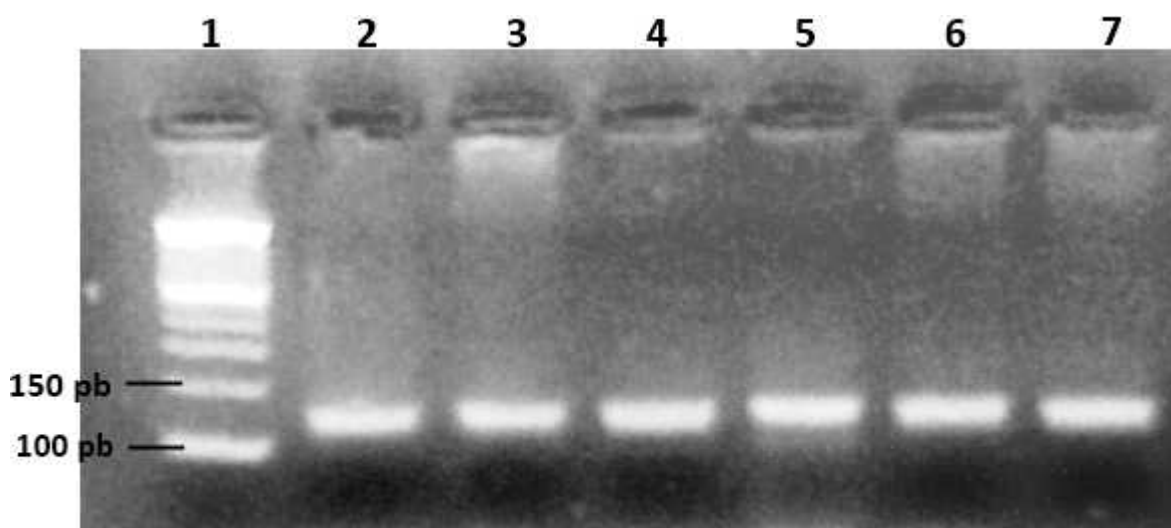
4.2. Rezultati lančane reakcije polimerazom za umnažanje biljega D1S468

Postupak optimizacije uvjeta za umnažanje biljega D1S468 započeli smo određivanjem temperature *annealinga*, odnosno optimalne temperature pri kojoj će se polimeri pravilno spariti sa DNA koja služi kao kalup za sintezu nove molekule. Po preporuci literaturnih izvora, PCR smo izveli u uvjetima prikazanim u Tablici 5.

Tablica 5. Uvjeti metode PCR za umnažanje biljega D1S468.

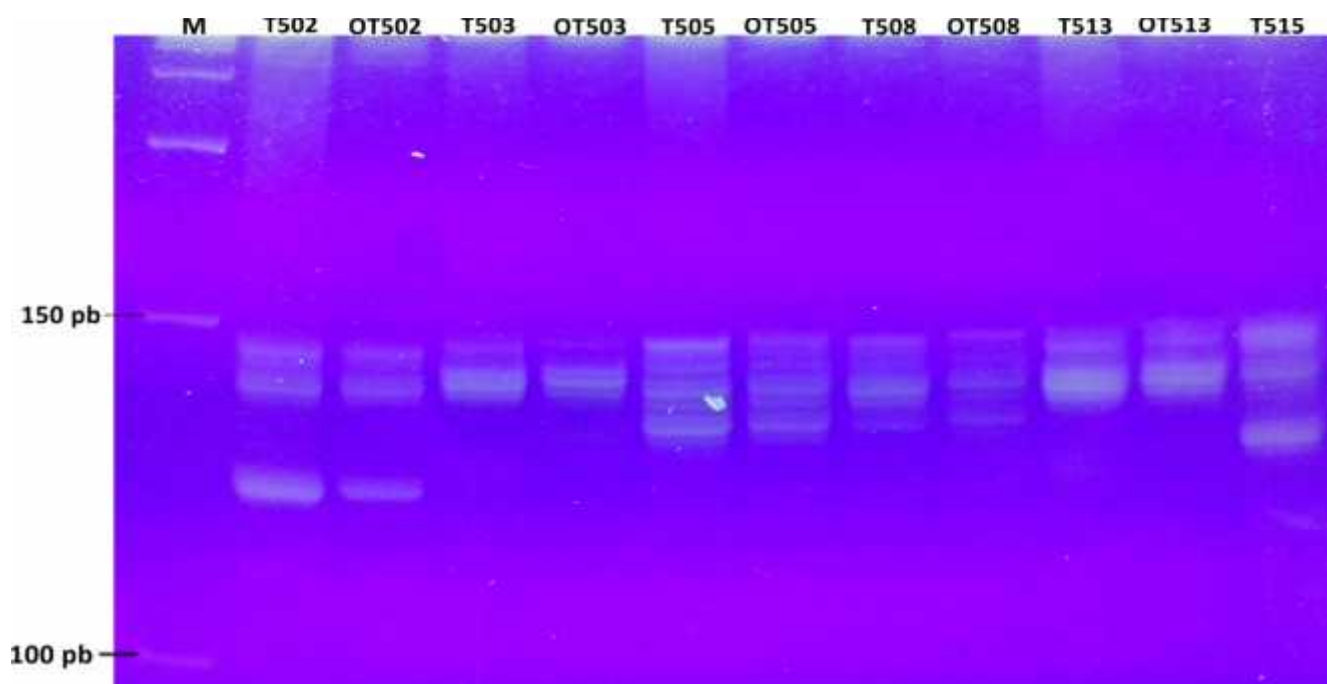
(Pred) denaturacija	Denaturacija	Sparivanje po etnicima	Sinteza DNA	Završna sinteza DNA
94°C / 5 min	94°C / 30 sec	60°C / 30 sec	72°C / 30 sec	72°C / 10 min
40 ciklusa				

Nakon reakcije, uspješnost amplifikacije provjerili smo elektroforezom na agaroznom gelu te dobili vrlo jasne i izražajne vrpce koje su, uspoređujući i sa korištenim biljekom poznatih veličina, iznosile oko 135 pb (Slika 4.), što odgovara podacima iz literature. Ti rezultati nam govore da su svi uzorci vrlo uspješno umnoženi u PCR-u pri zadanim uvjetima te da ti uvjeti predstavljaju optimalne uvjete za umnažanje ovog mikrosatelitnog biljega.



Slika 4. Agarozni gel nakon PCR-a za umnažanje mikrosatelitnog biljega D1S468 (1-biljeg poznatih veličina; 2, 4, 6 – uzorci DNA izolirani iz tkiva; 3, 5, 7 – uzorci DNA izolirani iz krvi).

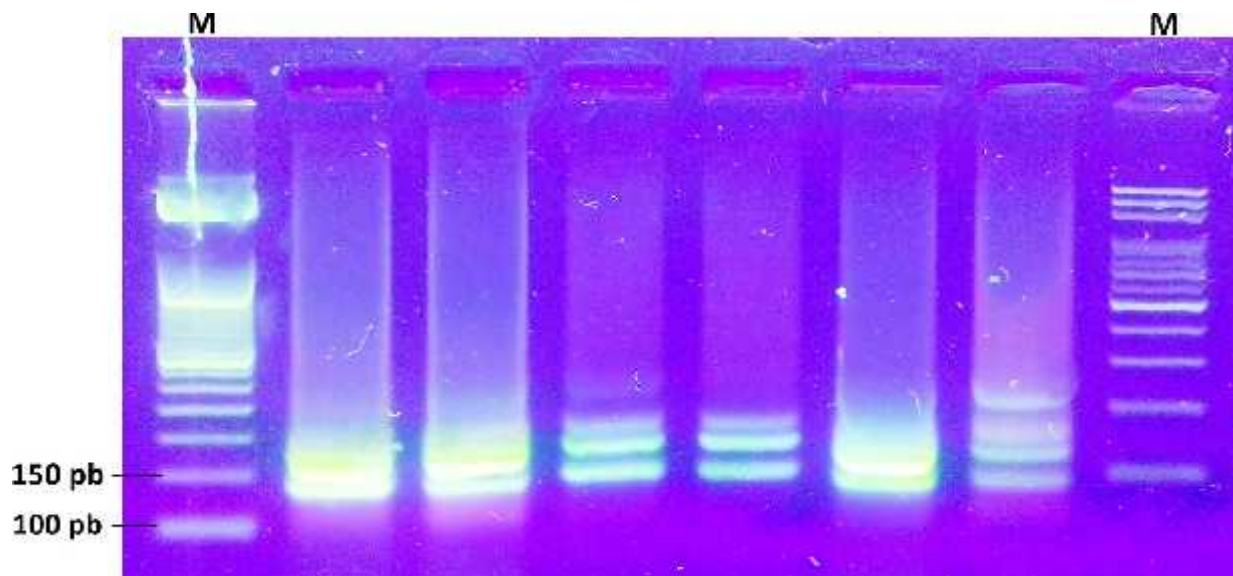
Kao dodatnu analizu, uzorke smo postavili i na Spreadex gel. Rezultati Spreadex gela su također pokazali uspješnost PCR reakcije na njemu i da smo na njemu dobili vrlo jasne vrpce čije su veličine također odgovarale očekivanima (Slika 5). Takvi rezultati su vrlo korisni za daljnje analize genoma, kao što je u ovom slučaju detekcija gubitka heterozigotnosti (*eng. loss of heterozygosity*, LOH).



Slika 5. Elektroforeza na Spreadex gelu (M – biljeg poznatih veličina, 100 kb) mikrosatelitnog markera D1S468.

4.3. Rezultati PCR-a za umnažanje biljega D1S243

Umnažanje biljega D1S243 tako er smo zapo eli na temperaturi za sparivanje po etnica od 60°C te i ostalim uvjetima kao i biljeg D1S468. Me utim, nakon prve reakcije i provjere na agaroznom gelu, uo ili smo višestruke vrpce kod ve ine uzoraka (Slika 6.) što nam je ukazivalo na nespecifi nu reakciju sparivanja po etnica, odnosno, po etnice su se sparile i sa nekim drugim odsje cima DNA kalupa te su se na taj na in, osim našeg željenog, umnožili i neki neželjeni produkti druga ijih molekularnih masa. U ovakvim slu ajevima PCR se smatra neuspješnim jer nespecifi na amplifikacija onemogu ava daljnje, preciznije analize kao što su gubitak heterozigotnosti (LOH) te mikrosatelitna nestabilnost (MI).



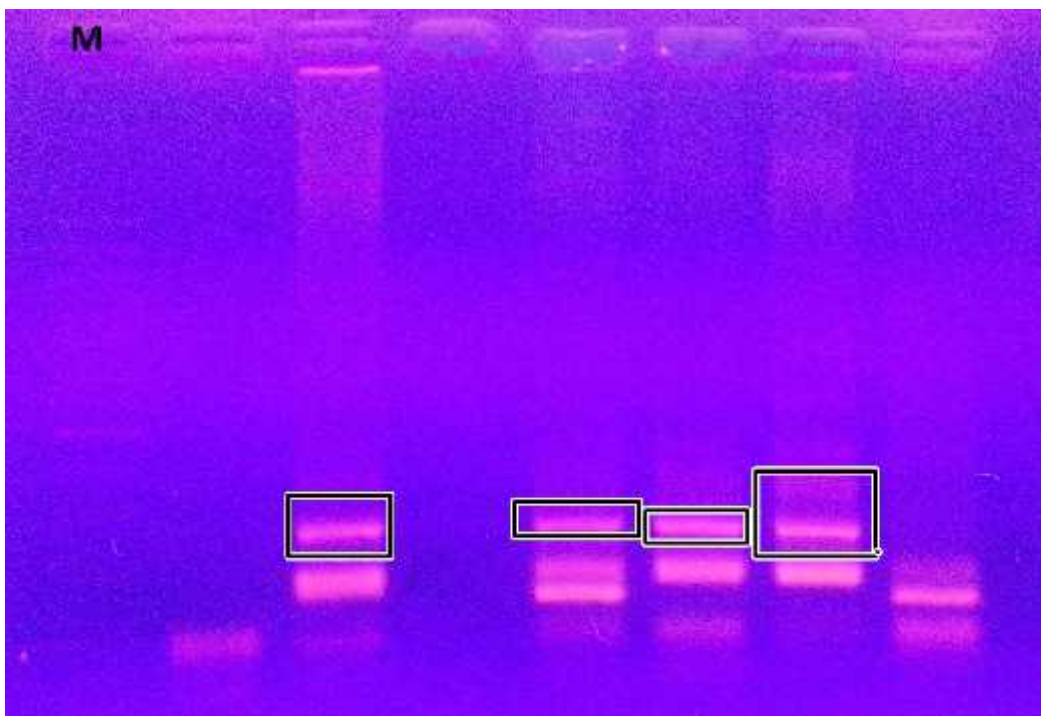
Slika 6. Provjera uspješnosti PCR-a za umnažanje biljega D1S243 (M – biljeg poznatih veličina).

Prema literaturi, vrpce smo o ekivali izme u 142 i 170 pb. Prema biljegu poznatih veli ina na gelu vidimo da na tim veli inama imamo vrlo intenzivne vrpce, me utim, zbog relativno intenzivnih vrpce i na ostalim veli inama, ove rezultate ne možemo smatrati uspješnima.

Da bismo optimizirali uvjete u sljede em koraku promjenili smo temperaturu sparivanja po etnica. Sada smo ovu temperature izra unali pomo u formule:

$$T_m = 2 (NA + NT) + 4 (NG + NC) - 5$$

gdje je N broj ponavljanja odre enog nukleotida unutar po etnice. Ovim izra unam dobili smo temperaturu od 53°C te pri tim uvjetima izveli novi PCR. Rezultati su prikazani na Slici 7.



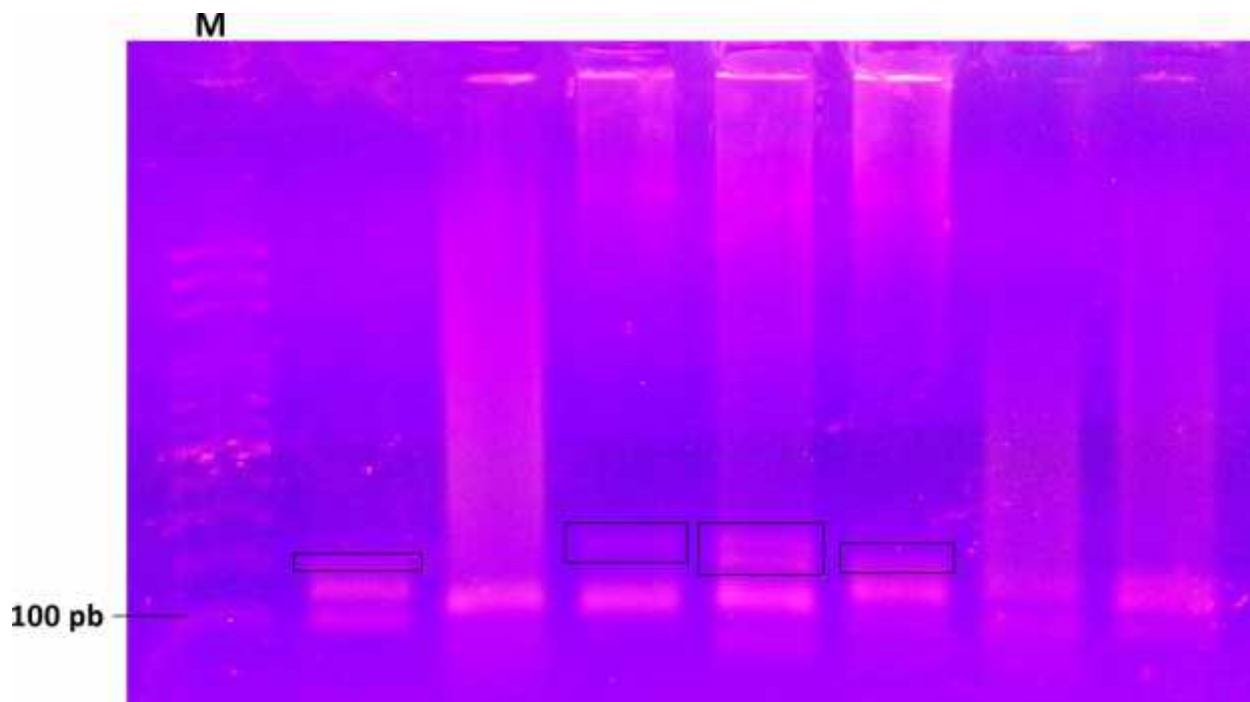
Slika 7. Provjer rezultata PCR-a nakon promjene temperature sparivanja početnica pri 53°C za umnažanje mikrosatelitnog biljega D1S243. Zaokruženi su nespecifični produkti (M- biljeg poznatih veličina).

Kao što je vidljivo sa slike 7., razina nespecifičnih produkata se smanjila a željeni produkti su intenzivni i u razini željenih molekulskih masa prema biljegu. Međutim, nespecifičnost je i dalje prisutna stoga ove rezultate ne možemo smatrati uspješnima, odnosno uvjete optimalnima.

S obzirom na ove rezultate, pretpostavili smo da su po etnicama koje smo koristili prekratke te da se zato vrlo nespecifično vežu za kalup, stoga smo napravili nove po etnicama sljedećeg sastava:

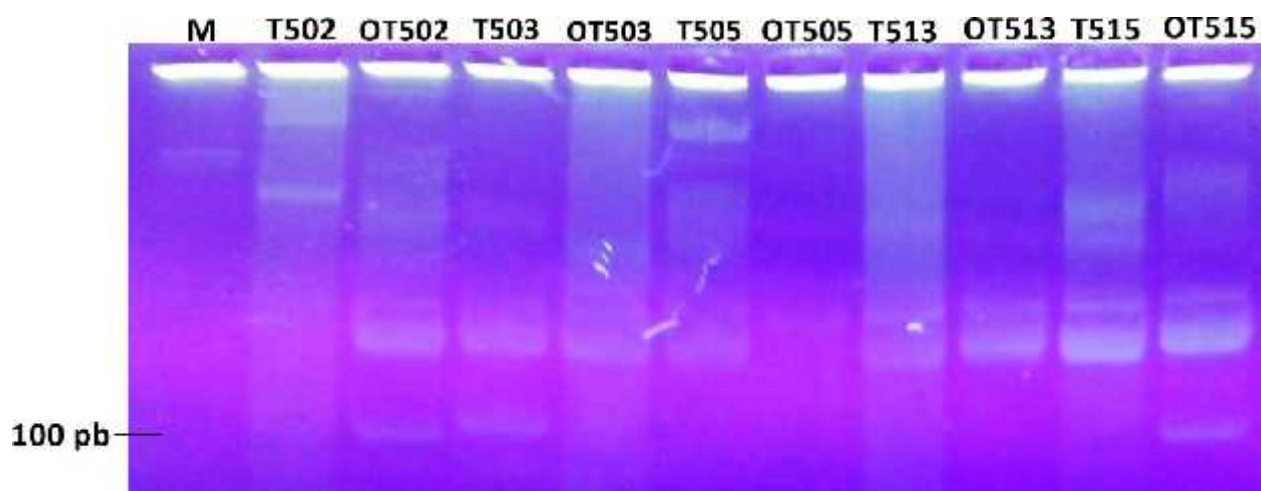
TGA GCC TCC CAC GCC TCA GTT T
ATG GAC TTT TCC GGC CTT GGG T

S novim po etnicama izveli smo PCR na dvjema različitim temperaturama sparivanja po etnicama: 60°C i 56°C. Ta reakcija je pokazala manji udio nespecifičnih produkata (na 56°C nešto manje nego na 60°C) (Slika 8.) od one s kraćim po etnicama, međutim njihova količina i dalje je prevelika da bi se ovi uvjeti pokazali optimalnima.



Slika 8. Rezultati provjere uspješnosti PCR-a s duljim početnicama za umnažanje biljega D1S243. Zaokruženi su nespecifični produkti (M – biljeg poznate veličine).

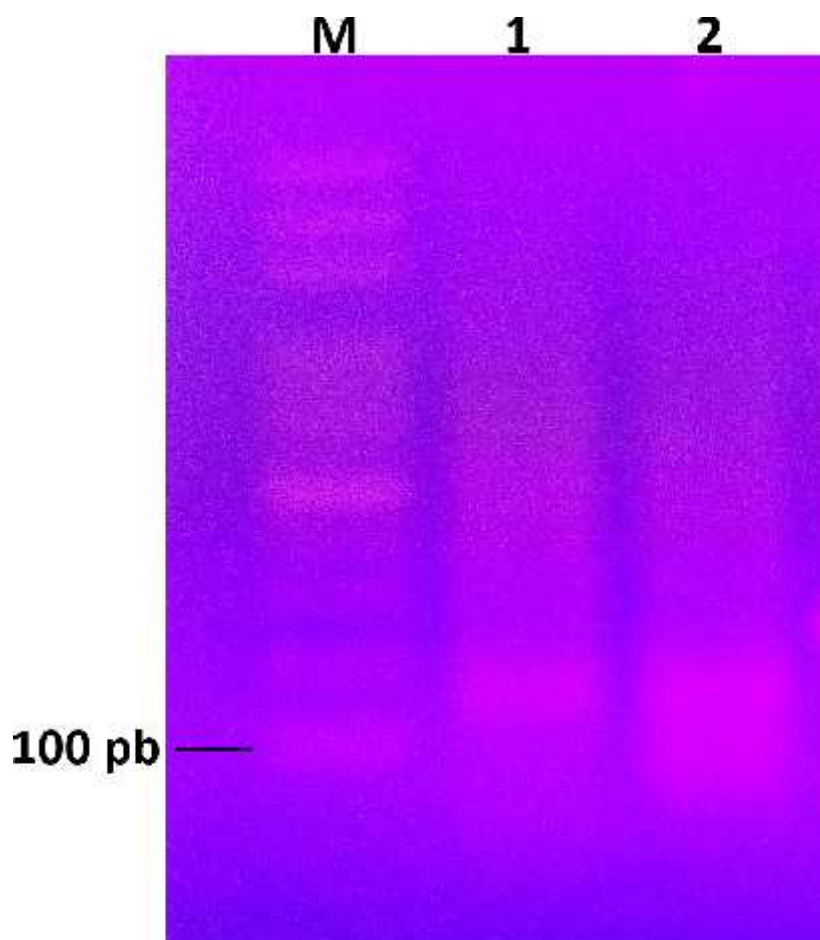
Iste ove uzorke smo nanijeli i na Spreadex gel. Rezultati su pokazali da su produkti reakcije sa ovako duga kim po etnicama preduga ki da bi se pravilno odvojili na vrlo preciznom gelu kao što je Spreadex (Slika 9.).



Slika 9. Elektroforeza na Spreadex gelu nakon reakcije sa duljim početnicama za umnažanje biljega D1S243. Po sredini gela vidimo nespecifična umnažanja dok su naši ciljni produkti zaostali na vrhu, samom izlasku iz jažica (M - biljeg poznatih veličina).

Nakon ovakvih rezultata, izveli smo još nekoliko reakcija u kojima smo mjenjali temperature sparivanja po etnica (gradijent od 55°C do 65°C) te broj ciklusa (od 35 do 40). Tako er, mjenjali smo sve parametre koji su prema literaturi mogli biti klju ni (sterilnost vode, duljinu ostalih faza PCR-a itd.). Uvjeti od 57°C i 40 ciklusa pokazali su se dovoljno uspješnima za daljnje analize s obzirom da je intenzitet nespecifi nih vrpce, iako prisutan, bio zanemariv.

Nakon daljnjih konzultacija s literaturom, isprobali smo još tri reakcije sa sljede im uvjetima: po etna denaturacija pri 94°C trajala je 4 min, zatim je slijedilo 25 ciklusa denaturacije pri 94°C 30 sec, sparivanja po etnica pri 60°C 15 sec te produljivanje pri 72°C 30 sec (Benn i sur. 2000). Paralelno sa ovom reakcijom, napravili smo i reakciju sa uvjetima iz Nakamoto i sur. (2006) koji su bili sljede i: po etna denaturacija 15 min pri 94°C, zatim 40 ciklusa od 20 sec pri 94°C, sparivanje po etnica 30 sec pri 62°C te 30 sec pri 72°C, završno produljivanje trajalo je 6 min pri 72°C. Rezultati dobiveni pri ovim uvjetima prikazani su na Slici 10.



Slika 10. Prikaz rezultata provjere uspješnosti PCR-a za umnažanje biljega D1S243 (M – biljeg poznatih veličina; 1 – uzorak rađen pri uvjetima iz Benn i sur.(2000); 2 – uzorak rađen pri uvjetima iz Nakamoto i sur.(2006).

Što se tiče homozigotnosti i heterozigotnosti, od ukupnog broja uzoraka na kojima je provedena daljnja analiza, kao rezultat smo dobili: za mikrosatelitni biljeg D1S468, bio je prisutan kao heterozigot u jednom od 21 uzorka što je 95% ukupnog broja uzoraka. Mikrosatelitni biljeg D1S243 također je bio prisutan kao heterozigot u jednom od 9 analiziranih uzoraka što iznosi 88%.

5. Rasprava

Lanana reakcija polimerazom (PCR) iako, u okvirima molekularne biologije, relativno stara metoda, i dalje je jedna od najkorisnijih metoda u modernoj molekularnoj biologiji, posebice za potrebe raznih genskih analiza. Iako je tijekom više od 25 godina postojanja dovedena gotovo do savršenstva i iako je razvijeno nebrojeno puno varijanti za različite uporabe, optimizacija uvjeta za njezino pravilno funkcioniranje i dalje je dugotrajan proces koji se uvijek ispočetka mora provoditi za svaki pojedini eksperiment.

Važnost ove metode leži ponajviše u činjenici da se njome mogu amplificirati, odnosno umnožiti vrijedni, i puno puta teško dostupni uzorci vrlo malih koncentracija do te mjere da se jedna te ista DNA nesmetano može koristiti za eksperimente. Važnost ove činjenice najviše dolazi do izražaja u biomedicini, ponajviše onkologiji, gdje uzorci najčešće potječu od stvarnih pacijenata, te su samim time vrlo dragocjeni s obzirom da se pri njihovom uzimanju mora poštovati privatnost pacijenta, te njegovo najčešće teško, zdravstveno stanje.

Da bi se iz takvih uzoraka izvukao maksimum uz pomoć PCR-a, optimizacija uvjeta reakcije presudan je korak. Uvjeti se određuju ponajviše s obzirom na sastav pojedinačnih komplementarnih odsjeka DNA, odnosno genoma na njoj, od interesa. Standardni PCR najčešće se izvodi u 3 faze: 1) denaturacija, pri 95°C, u kojoj se odvajaju lanci dvolančane DNA; 2) sparivanje pojedinačnih komplementarnih odsjeka DNA, pri 60°C, gdje se pojedinačne komplementarne odsjeke DNA te 3) produljivanje novosintetizirane DNA pri 72°C, u kojoj se pojedinačne komplementarne odsjeke DNA produljuju po komplementarno s kalupom u novu molekulu DNA. Sve se to najčešće odvija u 40 ciklusa. Iako se ovi uvjeti smatraju standardnima, gotovo svaki eksperiment zahtjeva proces njihove optimizacije.

Ove standardne temperature su određene s obzirom na prosječni sastav nukleotida u pojedinačnim komplementarnim odsjecima DNA. Sastav nukleotida ujedno određuje i udio G-C i A-T parova. S obzirom da se G-C parovi vežu trostrukim (stabilnijim) a A-T dvostrukim (manje stabilnim) vezama, temperatura sparivanja pojedinačnih komplementarnih odsjeka DNA i kalupa kod pojedinačnih komplementarnih odsjeka DNA s višim GC udjelom je niža od one potrebne kod pojedinačnih komplementarnih odsjeka DNA s višim AT udjelom. Međutim, koliko god ovo jednostavno zvučalo u teoriji, biološki sustavi su nepredvidljivi te često dvije pojedinačne komplementarne odsjeke DNA sa istim GC udjelom imaju različite temperature sparivanja. Općenito, DNA odsjeci sa visokim GC udjelom se smatraju problematičnim regijama za umnažanje i vrlo često se izbjegavaju u radu (NFSTC; <http://www.nfstc.org>).

Po etnice za umnažanje biljega D1S468 od ukupno 20 nukleotida (1. po etnica), odnosno 22 nukleotida (2. po etnica) imaju samo 9 gvanina i citozina. Ovaj udio ini ga odsje kom sa ve inskim AT udjelom što ga u teoriji ini odsje kom relativno lakim za umnažanje, odnosno za optimiziranje uvjeta za umnažanje. U našem eksperimentu, uvjete za ovu reakciju smo optimizirali vrlo lako te su reakcije bile vrlo uspješne koriste i teoretski odre ene uvjete.

S druge strane, po etnice za umnažanje biljega D1S243 od ukupno 18 nukleotida (1. i 2. po etnica) imaju 11 (i prva i druga) gvanina i citozina što ih ini DNA odsje cima sa ve inskim GC udjelom. Samim time, ovi biljezi spadaju u ve spomenute, za umnažanje problemati ne sekvence što se pokazalo i u prakti nom dijelu našeg eksperimenta. Kada smo produljenjem po etnica za 4 nukleotida smanjili udio GC nukleotida, oligonukleotidi su pokazali bolje sparivanje.

Još jedan od razloga zbog koji smo produljivali po etnice je i pove anje specifi nosti vezanja. Naime, po etnice su dijelovi DNA koji su komplementarni našem željenom odsje ku genomske DNA molekule. Me utim, s obzirom da je mikrosatelitni biljeg D1S243 duga ak izme u 142 i 170 parova baza, vrlo je teško odrediti to no specifi nu po etnicu koja e biti dovoljno duga ka da se veže samo i isklju ivo na naš željeni dio a opet dovoljno kratka da se uspješno u potpunosti spari na po etak istog tog odsje ka te tako zapo ne sintezu nove molekule. Me utim, u našem eksperimentu produljenje po etnice se nije pokazalo dovoljnim za potpunu optimizaciju ovog odnosa.. Ostale komponente reakcije kao što su kemikalije, njihov omjer u glavnoj smjesi te sami stroj za izvedbu, smo isklju ili kao razlog neuspješnosti PCR-a jer smo prvi biljeg, D1S468 uspješno umnožili koriste i iste te komponente.

Izvedbom PCR-a pri uvjetima sa smanjenim brojem ciklusa (Bonn i sur, 2000), uspješno smo umnožili željeni produkt uklonivši ve inu nespecifi nih produkata. Smatramo da je uzork tome manji broj ciklusa te da se nespecifi ni produkti stvaraju upravo u kasnijim ciklusima reakcija, stoga se ovim smanjenjem sprije io njihov nastanak. Ovi uvjeti koristit e se za daljnje analize umnoženih mikrosatelitnih biljega.

Naši uzorci pokazali su 95% heterozigotnosti za mikrosatelitni biljeg D1S468 što je nešto ve i broj od onog prona enog u literaturi koji iznosi 75%. Što se ti e biljega D1S243, bilo je vrlo teško odrediti postotak heterozigotnosti s obzirom na poteško e pri umnažanju mikrosatelitnih biljega kao i poteško e pri njihovoj analizi na Spreadex gelu. Prema literaturi, njihov postotak heterozigotnosti iznosi 86%, što je i potvrdila naša gruba analiza na samo 9 uspjelih uzoraka od kojih je 8 heterozigota (88%) (GeneCards; <http://www.genecards.org>).

Ovi mikrosatelitni biljezi smješteni su vrlo blizu gena *Dishevelled1* na kromosomu 1p36, odnosno na maloj udaljenosti ispred i iza njega. Stoga, njihovim umnažanjem a kasnije i daljnjom genskom analizom, dobivamo vrlo dobar i pouzdan uvid u promjene gena *DVL1* u glioblastomima. Upravo ta saznanja u budućnosti mogu doprinijeti razvoju tumorskih terapija.

6. Zaključak

Dobiveni rezultati važni su za analizu gena *DVLI* koji pokazuje ulogu u tumorigenezi glioblastoma. U ovom radu, radili smo na optimizaciji uvjeta lanane reakcije polimerazom za umnažanje mikrosatelitnih biljega za gen *Dishevelled1* u glioblastomima. Optimizacija tih uvjeta pokazala se vrlo bitnim faktorom kada je riječ o bilo kakvoj genskoj analizi ovom metodom. Mikrosatelitni biljeg D1S468 pokazao se kao regija zahvalna za umnažanje s obzirom da su eksperimentom dobiveni vrlo jasni i specifični produkti. S druge strane, biljeg D1S243 pokazao se vrlo kompleksnim kada je o umnažanju riječ. Njegovu kompleksnost smo povezali s njegovim biokemijskim sastavom. Također, optimizirali smo uvjete za njegovo specifično umnažanje,

Dobiveni rezultati doprinose boljem i specifičnijem umnažanju mikrosatelitnih biljega D1S468 i D1S243 kojima se određuje mikrosatelitna nestabilnost i gubitak heterozigotnosti gena *DVLI*. S obzirom da su genetičke promjene tog gena vrlo vjerojatno uključene u nastanak glioblastoma, rezultati ovih istraživanja predstavljaju temelj na kojem se nastaviti istraživati uloge puta wnt nastanku i progresiji tumora.

7. Literatura

Alcantara Llaguno SR, Chen J, Parada LF (2009) Signaling in Malignant Astrocytomas: Role of Neural Stem Cells and its Therapeutic Implications. Clin Cancer Res. 15: 7124-7129.

Aoki M, Hecht A, Kruse U, Kemler R, Vogt PK (1999) Nuclear endpoint of Wnt signalling: Neoplastic transformation induced by transactivating lymphoid-enhancing factor 1. Proc Natl Acad Sci USA. 96: 139-144.

Arce L, Yokoyama NN, Waterman ML (2006) Diversity of LEF/TCF action in development and disease. Oncogene. 25: 7492-7504.

Astudillo P, Larraín J (2014) Wnt signaling and cell-matrix adhesion. Curr Mol Medicine. 14(2): 209-220.

Bedell JA, Wagner-McPherson CB, Bengtsson U, Handa K, Dumars KW, Marsh J L, Smith M, McPherson JD (1996) A 1p deletion syndrome patient is hemizygous for a human homologue of the *Drosophila* dishevelled gene. Am J Hum Genet ;59: 313-321.

Belden CJ, Valdes PA, Ran C, Pastel DA, Harris BT, Fadul CE, Israel MA, Paulsen K, Roberts DW (2011) Genetics of Glioblastoma: A Window into Its Imaging and Histopathologic Variability. RadioGraphics. 31: 1717-1740.

Bonavia R, Inda M-del-M, Cavenee W, Furnari F (2011) Heterogeneity Maintenance in Glioblastoma: a social network. Cancer Res. 71: 4055-4060.

Collins VP (2004) Brain tumours: Classification and genes. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 75(Suppl II): ii2-ii1.

Dillman AR, Minor PJ, Sternberg PW (2013) Origin and Evolution of Dishevelled. G3 (Bethesda). 3(2): 251–262.

Fahmy OG, Fahmy MJ (1959) Interallelic complementation in the r locus of *D. melanogaster*. New mutant report. Dros Inf Serv;33: 85.

Jung H, Kim B-G, Han WH, Lee JH, Cho J-Y, Park WS, Maurice MM, Han J-K, Lee MJ, Finley D, Jho E-H (2013). Deubiquitination of dishevelled by Usp14 is required for Wnt signaling. Oncogenesis; 2.

- Kanu OO, Huges B, Di C, Lin N, Fu J, Binger DD, Yan H, Adamson C (2009) Glioblastoma Multiforme Oncogenomics and Signaling Pathways. *Clin Med Oncol.* 3: 39-52.
- Klaus A, Birchmeier W (2008) Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nature Reviews Cancer* 8: 387-398.
- Lee Y-N, Gao Y, Wang H-y (2008) Differential mediation of the wnt canonical pathway by mammalian Dishevelleds-1, -2, and 3. *Cell Signal*; 20:443-52.
- Li X, Xu Y, Chen Y, Chen S, Jia X, Sun T, Liu Y, Li X, Xiang R, Li N (2013) SOX2 promotes tumor metastasis by stimulating epithelial-to-mesenchymal transition via regulation of Wnt/ β -catenin signal network. *Cancer Lett* 336:379-89.
- Logan CY, Nusse R (2008) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*; 20:781-810.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer B, Kleihues P (2007) The 2007 WHO Classification of Tumour of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol.* 114: 97-109.
- MacDonald BT, Tamai K, He X (2009) Wnt/ β -catenin signalling: components, mechanisms and diseases. *Dev Cell.* 17: 9-26.
- Mann B, Gelos M, Siedo A, Hanski ML, Gratchev A, Ilyas M, Bodmer WF, Moyer MP, Riecken EO, Buhr HJ, Hanski C (1999) Target genes of β -catenin-T-cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signalling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96: 1603-1608.
- Mason WP, Cairncross JG (2008) The expanding impact of molecular biology on the diagnosis and treatment of gliomas. *Neurology* ; 71: 365-373.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16(3): 1215.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol. 51: 263-350.

Nagahata T, Shimada T, Harada A, Nagai H, Onda M, Yokoyama S, Shiba T, Jin E, Kawanami O, Emi M (2003) Amplification, up-regulation and over-expression of DVL-1, the human counterpart of the *Drosophila* disheveled gene, in primary breast cancer. Cancer Sci. 10:1219-23.

Nikuševa Marti T, Pe ina-Šlaus N, Kušec V, Kokotovi T, Mušinovi H, Tomas D, Zeljko M (2010) Changes of AXIN-1 and Beta-Catenin in Neuroepithelial Brain Tumors. Pathol Oncol Res. 16: 75-79.

Nusse R, Varmus HE (2010) Three decades of Wnts: a personal perspective on how a scientific field developed. The EMBO J. 31: 2670–2684.

Oghaki H, Kleihues P (2007) Genetic Pathway to Primary and Secondary Glioblastoma. Am J Pathol. 170: 1445-1453.

Pažanin L (2011) Histopatologija glijalnih tumora mozga. Medicina fluminensis, Vol 47: 157-166.

Pe ina-Šlaus N (2010) Wnt signal transduction pathway and apoptosis: a review. Cancer Cell Int. 10: 22.

Pe ina-Šlaus N, Kafka A, Tomas D, Markovi L, Okstajner PK, Sukser V, Krušlin B (2014) Wnt signaling transcription factors TCF-1 and LEF-1 are upregulated in malignant astrocytic brain tumors. Histol Histopathol. Ahead of print.

Pe ina-Šlaus N, Nikuševa Marti T, Deak AJ, Zeljko M, Hraš an R (2010) Genetic and protein changes of E-cadherin in meningiomas. J Cancer Res Clin. Oncol. 136: 695-702.

Pizzuti A, Amati F, Calabrese G, Mari A, Colosimo A, Silani V, Giardino L, Ratti A, Penso D, Calza L, Palka G, Scarlato G, Novelli G, Dallapiccola B (1996). cDNA characterization and

chromosomal mapping of two human homologs of the *Drosophila* dishevelled polarity gene. Hum Mol Genet; 5:953-8.

Polakis P (2000) Wnt signalling and Cancer. Genes Dev. 14: 1837-1851.

Raviandranath A, O'Connell A, Johnston PG, El-Tanani MK (2008) The Role of LEF/tcf Factors in Neoplastic Transformation. Curr Mol Med. 8: 38-50.

Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular Cloning – a laboratory manual Volume 2. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Walker C, Baborie A, Crooks D, Wilkins S, Jenkinson MD (2011) Biology, genetics and imaging of glial cells tumours. Br J Radiol. 84: S90-S106.

Wallingford JB, Habas R (2005) The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. Development; 132: 4421-36.

Wharton KA (2003) Runnin' with the Dvl: Proteins That Associate with Dsh/Dvl and Their Significance to Wnt Signal Transduction. Dev Biol: 253:1-17.

Wong HC, Bourdelas A, Krauss A, Lee HJ, Shao Y, Wu D, Mlodzik M, Shi DL, Zheng J (2003) Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled. Mol Cell; 12:1251-60.

Yanfeng WA, Berhane H, Mola M, Singh J, Jenny A, Mlodzik M (2011) Functional dissection of phosphorylation of Dishevelled in *Drosophila*. Dev Biol; 360:132-42.

Zeljko M, Peina-Šlaus N, Nikuševa Martić T, Kušec V, Beroš V, Tomas D (2011) Molecular alterations of E-cadherin and beta-catenin in brain metastases. Front Biosci, E3:616-24.

Zeng X, Tamai K, Doble B, Li S, Huang H, Habas R, Okamura H, Woodgett J, He X (2005) A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. Nature. 438: 873-877.

Zhao Y, Yang Z-Q, Wang Y, Miao Y, Liu Y, Dai S-D, Han Y, Wang E-H (2010) Dishevelled-1 and Dishevelled-3 affect cell invasion mainly through canonical and noncanonical Wnt pathway, respectively, and associate with poor prognosis in nonsmall cell lung cancer. *Mol carcinog*; 49:760–70.

Gene Cards [<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=DVL1&search=DVL1>]

National Forensic Science Technology Center (NFSTC) [<http://www.nfstc.org>]

National Center for Biotechnology Informations (NCBI)

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=9606&query]

Protein Knowledgebase (UniProtKB) [<http://www.uniprot.org/uniprot/O14640>]